

COUNTWAY LIBRARY



HC 4Z XV 3

**W. Glikin, Methodik **
der Stoffwechselanalyse

Leipzig 1916
Georg Thieme.

Verlag von Georg Thieme in Leipzig.

Die Methoden der Organischen Chemie.

EIN HANDBUCH

für die Arbeiten im Laboratorium.

Bearbeitet von

Prof. Dr. K. ARNDT in Charlottenburg, Dr. A. AUFRECHT in Berlin, Dr. F. BAUM in Berlin, Prof. Dr. BERGELL in Berlin, Dr. P. BLUMBERG in Berlin, Prof. Dr. BYK in Charlottenburg, Prof. Dr. DENNSTEDT in Hamburg, Prof. Dr. FRANKE in Wien, Dr. O. GERNGROSS in Berlin, Dr. W. GLIKIN in Berlin, Priv.-Doz. Dr. H. GROSSMANN in Berlin, Prof. Dr. J. GYR in Freiburg (Schweiz), Dr. Chr. HANSEN, Ass. am chem. Inst. d. Universität Leipzig, Dr. ing. Eug. HEINLE in Stuttgart, Dr. J. HERZOG, Ass. am pharmaz. Inst. d. Universität Berlin, Priv.-Doz. Dr. J. HOUBEN in Berlin, Dr. R. KEMPF in Berlin, Dr. R. KRAUSS, Ass. am organ. Labor. d. Techn. Hochschule Berlin, Dr. K. LANGHELD in Kiel, Dr. W. C. de LEUW in Leyden, Dr. S. LINDENBAUM, Ass. am organ. Labor. d. Techn. Hochschule Berlin, Oberstabsapotheker a. D. Dr. W. LENZ in Berlin, Prof. Dr. J. MEISENHEIMER in Berlin, Prof. Dr. POSNER in Greifswald, Prof. Dr. J. SCHMIDT in Stuttgart, Dr. Br. SZELINSKI, Ass. am Staatslabor. in München, Prof. Dr. H. SIMONIS in Charlottenburg, Prof. Dr. R. STOERMER in Rostock, Prof. Dr. Th. WEYL in Berlin, u. A.

herausgegeben von

Prof. TH. WEYL,

Berlin.

2 Bände.

Mit 301 Textabbildungen.

M. 52.—, geb. M. 53.70.

Eine stattliche Reihe hervorragender Chemiker haben sich verbunden, um ein Werk zu schaffen, daß die im organischen Laboratorium geübten Verfahren sowohl dem Anfänger als dem Fortgeschritteneren zugänglich machen soll. Diese Arbeit entspricht einem Bedürfnis, das lange schon gehegt wurde. Bislang erschienen immer nur kleinere Werke dieser Art, ein großes Handbuch über die Arbeitsverfahren fehlte, und wird daher durch den „Weyl“ dem Lehrer wie dem Schüler eine willkommene Gabe gebracht. Besonders ist die reichhaltige Angabe der Originalliteratur hervorzuheben usw. Wir wünschen dem Werk eine recht weite Verbreitung.

(Pharmazeutische Zentralhalle.)

Methodik der Stoffwechselanalyse

Ein Handbuch zum Laboratoriumsgebrauch

von

Dr. W. Glikin^e †

Mit einem Vorwort von Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. N. Zuntz

Mit 44 Textabbildungen



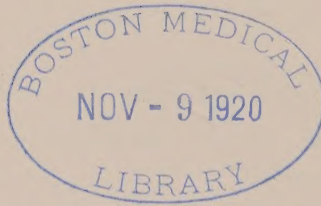
LEIPZIG 1916
VERLAG VON GEORG THIEME



5. M. 40.

18315-47

Copyright 1916 by Georg Thieme, Leipzig, Germany.



Vorwort.

Dr. W. Glikin, der Verfasser dieses Buches, hat sein Erscheinen nicht erlebt. Er erkrankte an einem schweren chronischen Leiden, während er mit der Abfassung des Werkes beschäftigt war und erlag seiner Krankheit, als der Satz nahezu vollendet war. Infolgedessen übernahmen eine Anzahl Freunde und Mitarbeiter des Verstorbenen die Korrekturen, wobei es sich nicht nur um Druckfehler, sondern noch um manche kleine offengelassene Daten handelte. Hoffentlich ist es uns gelungen, die Ergänzungen im Sinne des Verfassers auszuführen. Immerhin müssen wir den Leser um eine gewisse Nachsicht bitten, wenn er an einzelnen Stellen Druck- oder Zahlenfehler finden sollte. Bei der Sorgfalt, mit der Glikin alle seine Arbeiten ausführte, dürfte aber in irgend störendem Maße an solche Unebenheiten nicht zu denken sein.

Der allzu früh verstorbene Verfasser des Buches hat mir seit seiner Studentenzeit als hochgeschätzter Mitarbeiter nahegestanden. Seine Inaugural-Dissertation über die Methoden der Fettbestimmung ist in meinem Laboratorium entstanden. Seitdem hatte er hier einen ständigen Arbeitsplatz und hat sein chemisches praktisches Können durch Ausführung zahlreicher Analysen auf allen Gebieten der Nahrungsmittelkunde und des Stoffwechsels immer weiter vervollkommenet. So war er denn in hohem Maße zur Abfassung des vorliegenden Buches vorbereitet. Dabei kamen ihm zugute seine zahlreichen früheren Spezialarbeiten auf verwandten Gebieten, von denen hier genannt seien: Das Biochemische Taschenbuch, Berlin, Bornträger 1909, Die Kalorimetrische Methodik, ebenda 1911, das zweibändige Werk über die Chemie der Fette, Lipoide und Wachsarten, ebenda 1913. Neben dem hohen Maß von praktischen Erfahrungen des Verfassers kommt dem Buche seine außerordentliche Belesenheit und seine Geschicklichkeit der Darstellung in hohem Maße zustatten.

So hoffe ich denn, daß es seinen Weg in zahlreiche Laboratorien und in die Hand von vorwärts strebenden Studierenden finden wird.

Dem Verleger gebührt besonderer Dank für die schöne Ausführung der Abbildungen.

Berlin, den 4. April 1916.

N. Zuntz.

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
A. Brennwert der Nährstoffe	1
B. Mineralstoffe	9
C. Untersuchung der Nährstoffe	9
Vorbereitung und Probenahme der Nahrungsstoffe für die Unter- suchung; Bestimmung des Wassers bzw. der Trockensubstanz . .	10
I. Stickstoff	11
Das Verfahren von Kjeldahl.	
1. Bestimmung der Stickstoffsubstanz (Rohproteine) . . .	14
2. Quantitative Bestimmung der Eiweißkörper	14
Verdauliche Stickstoffsubstanz	17
3. Proteosen und Peptone	18
II. Hydrolyse der Proteine mittels Säuren	19
Isolierung der Mono- und Diaminosäuren.	
a) Monamminosäuren.	
1. Darstellung der Esterchlorhydrate	20
2. Isolierung der Aminosäureester aus den Esterchlor- hydraten	20
3. Fraktionierte Destillation der Monamminosäureester .	21
4. Destillationsrückstand	23
5. Isolierung von Aminosäuren aus Pflanzen	23
Identifizierung der einzelnen Monoaminsäuren	
1. Darstellung von β -Naphthalinsulfoderivaten	24
2. Darstellung von Phenylisocyanatverbindungen und der entsprechenden Hydantoine	25
3. Darstellung von Benzoylverbindungen	25
4. Darstellung von Formylverbindungen	25
b) Diaminosäuren (Hexonbasen)	25
1. Isolierung der Hexonbasen aus Eiweißsubstanz . . .	25
2. Isolierung der Hexonbasen aus Pflanzenextrakten .	26
3. Isolierung der Purinbasen aus Organen u. Geweben	27
4. Bestimmung der Gesamtmenge der Purinbasen in tierischen Organen	28
5. Quantitative Bestimmung der verschiedenen Purin- basen in tierischen Organen	28
6. Isolierung der Purinbasen aus Pflanzen	29
7. Trennung der Alloxurbasen	30
Die Verteilung des Stickstoffs in Eiweißmolekül	30
III. Stickstoffhaltige Substanzen nichteiweißhaltiger Natur . . .	31
Die Bestimmung des Aminosäure- und Säureamidstickstoffs	32
1. Ammoniakstickstoff	33
2. Salpetersäure	35
a) Bestimmung als Stickoxyd nach Schlösing und Grandeau	36
b) Bestimmung durch Reduktion z. Ammoniak	38
c) Gewichtsanalytische Bestimmung der Salpetersäure mittels Nitron nach Busch	40
IV. Bestimmung der stickstofffreien Extraktivstoffe	40
1. Bestimmung der in Wasser unlöslichen Stoffe	40
2. Bestimmung der wasserlöslichen Kohlehydrate	41

	Seite
3. Trennung der Dextrine von den Zuckerarten	41
a) Traubenzucker	41
b) Zuckerbestimmung nach Allihn	41
c) Gewichtsanalytische Bestimmung nach Pflüger	42
d) Maßanalytische Methode nach Fehling-Soxhlet	43
e) Fruktose	44
f) Galaktose	44
g) Invertzucker	45
h) Glukuronsäure	45
i) Rohrzucker (Saccharose)	47
k) Maltose	48
l) Raffinose	48
m) Pentosen und Pentosane	49
4. Trennung der einzelnen Zuckerarten voneinander	51
a) Bestimmung des Invertzuckers und Rohrzuckers nebeneinander	52
b) Bestimmung des Invertzuckers neben Dextrose bzw. anderer Zuckerarten nebeneinander	52
c) Bestimmung von Rohrzucker, Dextrose, Fruktose, Maltose, Isomaltose und Dextrin nebeneinander	53
5. Stärke	54
6. Glykogen	57
7. Zellulose	57
a) Bestimmung der Rohfaser nach Holdefleisch	58
b) Bestimmung der Rohfaser nach König	58
c) Bestimmung der Zellulose, des Lignins und Cutins nach König	59
V. Untersuchung des Fettes	59
1. Bestimmung des Wassergehaltes im Fette	59
2. Bestimmung des Gehaltes an fremden Substanzen	60
3. Bestimmung des Aschegehaltes im Fett	60
4. Bestimmung des Fettgehaltes	61
a) In einer Fettprobe	61
b) In tierischem und pflanzlichem Material	62
5. Bestimmung des Schmelz- und Erstarrungspunktes	66
a) Schmelzpunkt	66
b) Erstarrungspunkt	69
6. Spezifisches Gewicht	71
Bestimmung mit dem Pyknometer	71
7. Lichtbrechungsvermögen	74
8. Optisches Drehungsvermögen	74
9. Viskosität	74
VI. Quantitative Untersuchung der Fette, Öle und Wachse	75
Die Konstanten	75
1. Die Verseifungszahl	75
2. Die Reichert-Meißlsche Zahl	77
3. Die Hehnersche Zahl	78
4. Die Jodzahl	79
Die Bromaddition	79
Jodaddition	80
5. Die Säurezahl	82
6. Die Ätherzahl	83
7. Die Azetylzahl	84
8. Glycerin	86
a) Bestimmung des Glycerins nach dem Azetinverfahren	86
b) Bestimmung des Glycerins durch Spaltung mit Schwefelsäure	87
c) Bestimmung des Glycerins d. Oxydation mit Kalium- bichromat und Schwefelsäure	87
d) Bestimmung des Glycerins als Isopropyljodid	88
9. Monoglyceride und Diglyceride	89

	Seite
10. Bestimmung des Unverseifbaren	90
a) Direkte Wägung	91
b) Extraktion der Seifenlösung	91
c) Extraktion der trockenen Seifen	91
VII. Qualitative Prüfung der Fette und Öle	92
1. Elaidinreaktion	92
2. Chlorschwefelreaktion	93
3. Hexabromidprobe	93
4. Thermale Reaktionen	94
a) Temperaturerhöhung mit konzentrierter Schwefel- säure	94
b) Temperaturerhöhung beim Vermischen mit Chlor- schwefel	94
c) Temperaturerhöhung beim Bromieren der Öle	94
5. Sauerstoffabsorption	94
VIII. Untersuchung der Fettsäuren	95
1. Freie Fettsäuren, Neutralfett und mittleres Molekular- gewicht der Fettsäuren	95
2. Laktone	96
3. Flüchtige und lösliche Fettsäuren	97
4. Trennung der gesättigten von den ungesättigten sowie der flüssigen und festen Fettsäuren	97
5. Bestimmung der Ölsäure	100
6. Bestimmung der gesättigten Fettsäuren	101
a) Bestimmung der Stearinsäure u. Palmitinsäure . . .	101
b) Bestimmung der Arachinsäure u. Lignozerin-säure . .	102
7. Bestimmung der einzelnen ungesättigten Fettsäuren . .	103
8. Oxyfettsäuren	106
IX. Untersuchung der unverseifbaren Bestandteile	107
1. Mineralöle	109
2. Harzöle	109
3. Teeröle	110
X. Bestimmung und Trennung der Mineralstoffe	110
Aschenanalyse	110
1. Erdalkalien und Alkalien	114
2. Schwermetalle	116
a) Eisen	117
b) Mangan	119
c) Aluminium	119
d) Kupfer	120
e) Bestimmung des Bleies	120
3. Saure Bestandteile der Asche	121
a) Kohlensäure	121
b) Chlorwasserstoffsäure	122
c) Jodwasserstoffsäure	123
d) Bromwasserstoff	123
e) Fluorwasserstoff	123
f) Bestimmung der Schwefelsäure	123
g) Bestimmung der Phosphorsäure	124
XI. Bestimmung der Verbrennungswärme	127
1. Wärmeeinheit	127
2. Der Untersuchungsraum	128
3. Das Thermometer	129
4. Das Kalorimeter	129
5. Die kalorimetrische Bombe	129
6. Vorbereitung der Substanz	133
a) Feste Körper	133
b) Flüssige Körper	136
c) Alkoholartige Flüssigkeiten	137

	Seite
d) Blut	137
e) Öle	137
f) Harn	137
g) Gasförmige Körper	140
7. Vorbereitung der Bombe	141
8. Ausführung der Verbrennung	142
9. Berechnung einer kalorimetrischen Verbrennung	143
10. Beispiel einer kalorimetrischen Bestimmung	146
11. Wasserwert des Apparates	148
12. Verbrennung bei konstantem Druck und konstantem Volumen	150
D. Organische Elementaranalyse	151
1. Qualitative Analyse organ. Verbindungen	151
11. Quantitative Analyse organ. Verbindungen	153
a) Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs nach Liebig	153
b) Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs in stickstoffhaltigen organ. Substanzen	156
c) Bestimmung des Stickstoffs nach Dumas	157
d) Methode von Will und Varrentrapp	158
e) Quantitative Bestimmung der Halogene	158
f) Bestimmung des Phosphors und Arsens	159
g) Elementaranalyse mittels der Berthelotschen Bombe	160
E. Blut	164
1. Spezifisches Gewicht	164
2. Reaktion	165
3. Bestimmung der Reaktion ohne Entfernung der Eiweißstoffe nach Loewy	165
4. Bestimmung der Reaktion ohne Entfernung der Eiweißstoffe nach Hamburger	165
5. Stroma	168
6. Kernhaltige rote Blutkörperchen	169
7. Histopepton	170
8. Globin	170
9. Blutplättchen	170
F. Blutplasma und Blutserum	171
1. Fibrinogen	171
2. Fibrin	172
3. Nukleoproteid	174
4. Fibrinoglobulin	175
5. Serumglobuline	176
6. Darstellung des Serumglobulins durch Verdünnen oder Ansäuern	176
7. Darstellung und Bestimmung des Serumglobulins nach Hammarsten	177
8. Darstellung von fibrinogenfreiem Serumglobulin nach Reye	177
9. Fraktionierte Trennung der Serumglobuline	177
10. Serumalbumine	179
11. Quantitative Bestimmung des Gesamteiweißes	180
12. Proteinsäuren	180
13. Harnstoff	181
14. Kreatin und Kreatinin	182
15. Ammoniak	182
16. Harnsäure	183
17. Kohlehydrate	183
18. Milchsäure	186
19. Azeton	186
G. Blutfarbstoffe	187
1. Oxyhämoglobin	187
2. Hämoglobin	188
3. Methämoglobin	189

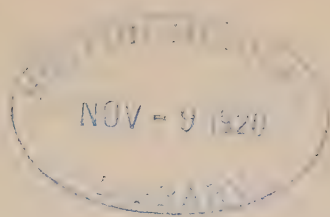
	Seite
4. Zyanhä moglobin (Zyanmethä moglobin)	190
5. Kohlenoxydhä moglobin	190
6. Stickoxydhä moglobin	191
7. Kathä moglobin	191
8. Hä mozyanin	191
9. Hä mochromogen	192
10. Hä matin	192
11. Hä min	193
12. Dehydrochloridhä min	196
13. Hä matoporphyrin	196
14. Mesoporphyrin	198
H. Galle	198
1. Glykocholsä ure	200
2. Glykocholeinsä ure	201
3. Taurocholsä ure	202
4. Taurocholeinsä ure	203
5. Cholsä ure	204
6. Choleinsä ure	207
7. Lithofellinsä ure	207
8. Taurin	208
I. Gallenfarbstoffe	208
1. Bilirubin	208
2. Biliverdin	209
3. Hydrobilirubin	210
4. Fett und Lipoide	210
5. Harnstoff	211
6. Quantitative Analyse der Galle nach Hoppe-Seyler und Hammarsten	211
7. Gallensteine	213
K. Verdauung	213
1. Speichel	213
2. Der Magensaft	215
3. Flüchtige Fettsäuren	220
4. Nachweis von Milchsäuren	220
5. Azeton	221
6. Eiweiß	221
7. Kohlehydrate	221
8. Gallenfarbstoff	221
9. Schwefelwasserstoff	222
10. Pepsin	222
11. Labferment (Chymosin)	225
12. Lipase	226
13. Blut im Mageninhalt	226
14. Darmsaft	226
15. Pankreassaft	227
L. Die Muskeln	229
1. Muskelplasma und Muskelserum	229
2. Proteine der quergestreiften Muskeln	230
3. Myosin	230
4. Myogen	231
5. Muskelstroma	231
6. Quantitative Bestimmung der Muskelproteine	231
7. Stickstoffhaltige Extraktivstoffe des Muskels	232
a) Isolierung von Kreatin, Kreatinin, Karnosin, Methylguanidin, Karnomuskarin, Neosin, Karnitin, Neurin, Cholin, Oblitin, Histidin und Vitalin nach Kutscher	232
b) Gewinnung von Karnosin, Methylguanidin und Karnitin aus frischem Rindfleischextrakt nach Gulewitsch und Kremberg	234
c) Kreatin	235
d) Kreatinin	236

	Seite
8. Inosit (Hexaoxyhexahydrobenzol)	238
9. d-Milchsäure (Paramilchsäure)	239
M. Milch	242
1. Kasein	244
2. Laktalbumin	247
3. Laktoglobulin	247
4. Kolostrumglobulin	248
5. Nukleon	248
6. Gesamtstickstoff	248
7. Gesamteiweiß	248
8. Milchzucker	250
9. Bestimmung der Mineralstoffe	252
10. Bestimmung des Säuregehaltes	252
N. Ei	253
1. Eiweißkörper des Vogeleies	253
2. Proteine des Eiweißes	254
3. Proteine des Eidotters	256
O. Nachweis und Bestimmung der Stoffwechselprodukte im Harn	256
1. Bestimmung des Trockenrückstandes	256
2. Gesamtstickstoff	257
3. Harnstoff	258
4. Kreatinin	261
5. Harnsäure	264
6. Purinbasen	268
7. Oxalsäure	271
8. Allantoin	273
9. Hippursäure	276
10. Benzoesäure	280
11. Phenole	280
12. Kresole	283
13. Ätherschwefelsäuren	285
14. Aromatische Oxysäuren	291
15. Homogentisinsäure	293
16. Kynurensäure	295
17. Harnfarbstoffe und Chromogene	296
18. Flüchtige Fettsäuren	304
19. Milchsäure	306
20. Organische Phosphorverbindungen	307
21. Tierisches Gummi, Harndextrine	308
22. Gepaarte Glukuronsäuren	309
23. Schwefelhaltige Verbindungen	312
a) Gesamtschwefel	312
b) Gesamtschwefelsäure	314
c) Ätherschwefelsäure	314
d) Neutralschwefel	314
e) Rhodanwasserstoff	315
f) Unterschweiflige Säure	316
g) Schwefelwasserstoff	317
h) Chondroitinschwefelsäure	317
i) Oxyproteinsäure	318
k) Antoxyproteinsäure	320
l) Alloxyproteinsäure	321
m) Uroferrinsäure	322
24. Anorganische Bestandteile	323
a) Chloride	323
b) Bromide	324
c) Jodide	325
d) Phosphate	326
e) Nitrate	327
f) Ammoniak	329
g) Kohlensäure	334
h) Kohlenstoff	335
i) Kieselsäure, Kalk, Magnesia, Kalium und Natrium	336
k) Eisen	339

	Seite
25. Eiweißkörper und Eiweißabbauprodukte	341
a) Eiweiß	341
b) Bence-Jonesscher Eiweißkörper	343
c) Nukleoalbumin und Muzin	346
d) Aminosäuren	347
26. Organische Harnbasen	351
a) Ätherlösliche Harnalkaloide	351
b) Amine	356
27. Blut und Blutfarbstoff	360
28. Gallensäuren	362
29. Gallenfarbstoffe	363
30. Kohlehydrate	365
a) Traubenzucker	365
b) d-Galaktose	369
c) Pentosen	373
d) Inosit	374
31. Azeton	375
32. Azetessigsäure	379
33. Oxybuttersäure	382
34. Fett	387
P. Kot	387
1. Vorbereitung des Kotes	387
2. Stickstoff und Stickstoffsubstanzen	389
3. Reinprotein	389
4. Proteinstoffe	390
5. Ammoniak	391
6. Trimethylamin	391
7. Diamine	391
8. Purinbasen	391
9. Indol	394
10. Skatol	395
11. Rohfaser	396
12. Zellulose	396
13. Stärke	398
14. Pentosane	398
15. Fett	398
16. Neutralfette und freie und gebundene Fettsäuren	398
17. Azeton	399
18. Phenole	399
19. Oxalsäure	399
20. Bernsteinsäure	400
21. Flüchtige Fettsäuren	400
22. Lecithin	401
23. Koprosterin	401
24. Milchsäure	403
25. Gepaarte Glukuronsäuren	405
26. Gepaarte Gallensäure und Cholsäure	405

Druckfehlerverzeichnis.

Seite 25	Zeile 8	von unten:	„konzentrierter“	statt	konzentrischer.
„ 25	„ 2	„	„ :	„ausgefällt“	statt ausgefüllt.
„ 26	„ 22	„ oben:	„bis“	statt	wenn.
„ 26	„ 33	„	„ :	„Pflanzenextrakt“	statt Pflanzenexrakt.
„ 31	„ 14	„ unten:	„nicht eiweißartiger“	statt	nicht eiweißhaltiger.
„ 37	„ 9	„	„ :	„V“	statt V'_0 .
„ 37	„ 9	„	„ :	„abgelesene“	statt abgelassene.
„ 37	„ 9	„	„ :	„Wasserdampftension“	statt Wassertension.
„ 37	„ 7	„	„ :	„der Seite 36 angegebenen“	statt einer empirisch.



A. Brennwert der Nährstoffe.

Lavoisier und Laplace gingen bei ihren Betrachtungen über die Quelle der tierischen Wärme von der Voraussetzung aus, daß die dem Körper zugeführten Nährstoffe bei ihrer Zersetzung die gleiche Wärmemenge entwickeln wie bei der Verbrennung im Kalorimeter. Sie haben Versuche nach dieser Richtung hin am Meerschweinchen im Eiskalorimeter ausgeführt, allerdings mit noch sehr primitiven Mitteln. Auch Dulong und Depretz finden noch bis 20 Proz. Abweichung der berechneten und gefundenen Wärmeabgabe der Tiere.

Rubner gebührt das Verdienst, den ersten exakten Beweis erbracht zu haben, daß die von einem Tiere in verschiedenen, über 45 Tage sich erstreckenden Versuchsreihen produzierte Wärmemenge bis auf nur 0,47 Proz. der aus den oxydierten Körper- und Nahrungsstoffen berechneten physiologischen Verbrennungswärme vollkommen entsprach. In neuerer Zeit hat W. Atwater derartige Versuche an Menschen ausgeführt.

Im Verbrennungskalorimeter oxydieren sich die stickstofffreien Stoffe — Fette und Kohlehydrate — in Wasser und Kohlensäure; die stickstoffhaltigen Stoffe bilden neben Wasser und Kohlensäure Stickgas sowie Spuren von Salpetersäure. Bei der vollständigen Verbrennung der einzelnen Nahrungsstoffe in der kalorimetrischen Bombe fand Stohmann folgende Werte:

für Kasein	5,86	Kal.
„ Eieralbumin	5,74	„
„ Konglutin.	5,48	„
„ Eiweißstoffe (Mittelzahl)	5,71	„
„ tierisches Gewebefett.	9,50	„
„ Butterfett	9,23	„
„ Rohrzucker	3,96	„
„ Milchzucker	3,95	„
„ Glukose.	3,74	„
„ Stärkemehl	4,19	„

Im Körper werden Fette und Kohlehydrate vollständig verbrannt, und man kann darum auch im großen und ganzen deren Endprodukte als identisch mit denen der Verbrennung im Kalorimeter ansehen.

Wesentlich verschieden verhalten sich die stickstoffhaltigen Nahrungsstoffe dadurch, daß sie im Körper unvollkommen verbrennen und spezifische Stoffwechselprodukte bilden, die sich im Harn und Kot ausscheiden. Der Wärmewert der Eiweißkörper innerhalb des Organismus unterscheidet sich daher wesentlich von dem mit dem Kalorimeter gefundenen. Rubner ¹⁾ bestimmte die Verbrennungswärme des Eiweißes im Körper, indem er einen Hund ausschließlich mit gewaschenem Fleisch fütterte, dessen Brennwert genau bestimmt war. Von diesem Wert zog er den Brennwert des Harnes und Kotes plus die zur Quellung des Eiweißstoffes und zur Lösung des Harnstoffes erforderliche Wärmemenge ab. In gleicher Weise bestimmte er die Verbrennungswärme des im Körper des Kaninchens beim Hungern zersetzten Eiweißes und fand als physiologische Verbrennungswärme für 1 g Eiweiß folgende Werte:

1 g Trockensubstanz	Kalorien
Eiweiß aus Fleisch	4,4
Muskel	4,0
N-haltige Körpersubstanz beim Hungern	3,8

Als Normalzahlen werden nach Rubner pro 1 g für animalisches Eiweiß 4,23 Kalorien, für 1 g vegetabilisches Eiweiß 3,96 Kalorien angenommen. Berücksichtigt man die Beteiligung der animalischen und vegetabilischen Eiweißkörper unter der Annahme, daß das Eiweiß der menschlichen Nahrung zu 60 Proz. aus animalischem und zu 40 Proz. aus vegetabilischem besteht, so erhält man

für animalisches Eiweiß	60	4,23	=	254,0	Kal.
für vegetabilisches Eiweiß	40	3,96	=	158,4	„
				<u>412,4</u>	Kal.

Die Mittelzahl für 1 g Eiweiß beträgt also **4,1** Kalorien. Im Durchschnitt werden für jede der Hauptgruppen der Nahrungsstoffe, auf gemischte Kost des Menschen bezogen, folgende Standardzahlen angenommen:

für 1 g Eiweiß	4,1	Kal.
„ 1 g Fett	9,3	„
„ 1 g Kohlehydrat	4,1	„

Rubner hat bei der Aufstellung der Standardzahlen für die Fette in der gemischten Kost des Menschen das Mittel der Verbrennungswärme für Olivenöl, Tierfett und Butterfett nach Stohmann 9,312 gerechnet. Die späteren Untersuchungen haben aber ergeben, daß dieser Wert um 0,105 Kal. zu niedrig war; also ist die Standardzahl auf **9,417** Kal. zu erhöhen. In gleicher Weise ist die Zahl für Stärke auf **4,2** Kal. zu erhöhen.

Rubner stellte sich zur Aufgabe, die Frage zu entscheiden, ob die mit den Nahrungsstoffen dem tierischen Organismus zugeführten chemischen Spannkkräfte gleichwertig sind, d. h. ob es gleichgültig ist, in welcher Form dem tierischen Organismus die chemische Energie

¹⁾ M. Rubner, Kalorimetrische Untersuchungen. Zeitschr. f. Biol. **21**, 250 (1885).

Einen ähnlichen Weg wie Rubner betritt auch E. Voit¹⁾, indem er die Berechnung der Verbrennungswärme aus der Elementarzusammensetzung vorschlägt. Er geht von dem Standpunkt aus, daß die Wärmetönung, mit der ein Verbrennungsprozeß verläuft, ebenso gut als Funktion der Sauerstoffmenge betrachtet werden kann, die bei der Verbrennung gebunden wird, als der Substanzmenge, die verbrannt wird. Kennt man die Elementarzusammensetzung einer Substanz, so läßt sich die zur Oxydation nötige Sauerstoffmenge aus folgender Formel berechnen:

$$100\ o = 8 \left(\frac{h}{1,01} + \frac{c}{3,0} + \frac{s}{5,30} \right) - o,$$

wo h, c, s, o den Wasserstoff-, Kohlenstoff-, Schwefel- und Sauerstoffgehalt von 100 g Substanz bedeuten, und O die zur Verbrennung von 1 g Substanz nötige Menge Sauerstoff (Sauerstoffkapazität der Substanz) bezeichnet.

Dividiert man die Verbrennungswärme von 1 g Substanz durch O, so erhält man den Wärmewert für 1 g Sauerstoff:

$$\frac{\text{Kal.}}{O} = K.$$

Die Sauerstoffkapazität kann man aus der Elementarzusammensetzung berechnen, und wenn der Wert K bekannt ist, kann man also die Verbrennungswärme einer chemischen Verbindung oder eines bekannten Gemenges von solchen berechnen. Der Vorzug dieser Berechnungsmethode liegt darin, daß die Werte für K nur innerhalb enger Grenzen schwanken und für Verbindungen ähnlicher Atomgruppierung nahezu übereinstimmen, und es genügt deshalb in einem Falle, K zu bestimmen, um damit die Verbrennungswärme für alle Substanzen ähnlicher Herkunft berechnen zu können, wie aus nachstehender Tabelle ersichtlich ist.

	K. in g-Kal.	O ₂ -Kapa- zität für 1 g	Verbrennungswärme für 1 g in Grammkalor.	
			gefunden	berechnet mit Mittel- wert von K.
Niedere Fettsäuren				
Essigsäure	3272	1,067	3490	3494
Buttersäure	3278	1,818	5959	5954
Mittel	3275	—	—	—
Hohe feste Fettsäuren				
Kaprinsäure	3255	2,605	8478	8487
Laurinsäure	3257	2,720	8859	8862
Palmitinsäure	3259	2,875	9369	9367
Stearinsäure	3259	2,930	9549	9546
Behensäure	3260	3,012	9819	9813
Mittel	3258	—	—	—
Hohe flüssige Fett- säuren				
Ölsäure	3288	2,893	9514	9466
Elaidinsäure	3266	2,893	9448	9466

¹⁾ E. Voit, Die Berechnung der Verbrennungswärme mittels der Elementarzusammensetzung. Zeitschr. f. Biol. 44, 345 (1903).

	K. in g-Kal.	O ₂ -Kapa- zität für 1 g	Verbrennungswärme für 1 g in Grammkalor.	
			gefunden	berechnet mit Mittel- wert von K.
Erukasäure	3271	2,982	9755	9757
Brassidinsäure	3264	2,982	9734	9757
Mittel	3272	—	—	—
Künstliche Fette				
Trilaurin	3272	2,734	8945	8943
Trimyristin	3273	2,814	9211	9205
Trieruzin	3274	2,980	9728	9748
Tribrassidin	3264	2,980	9728	9748
Mittel	3271	2,877	—	—
Natürliche Fette				
Tierfett	3293	2,884	9500	9434
Butterfett	3248	2,843	9231	9299
Mittel	3271	2,863	—	—
Kohlehydrate				
Xylose	3511	1,067	3746	3752
d-Glukose	3508	1,067	3743	3752
Maltose	3520	1,123	3949	3950
Stärke	3530	1,185	4183	4168
Mittel	3517	—	—	—
N-haltige Zersetzungs- produkte				
Glykokoll	3258	0,960	3128	3114
Alanin	3231	1,348	4356	4373
Leuzin	3242	2,015	6533	6537
Mittel	3244	—	—	—
Asparaginsäure	3211	0,902	2896	2900
Asparagin	3218	1,091	3511	3508
Mittel	3215	—	—	—
Tyrosin	3266	1,812	5918	5911
Hippursäure	3258	1,743	5678	5686
Mittel	3262	—	—	—
Sarkosin	3343	1,348	4507	4501
Kreatin	3335	1,282	4275	4281
Mittel	3339	—	—	—
Harnstoff	3171	0,800	2537	2549
Harnsäure	3198	0,857	2741	2730
Guanin	3190	1,219	3885	3884
Mittel	3186	—	—	—
Eiweißkörper				
Pflanzenfibrin	3307	1,797	5942	5927
Legumin	3291	1,760	5793	5804
Konglutin	3295	1,663	5479	5484
Mittel	3298	—	—	—
Serumalbumin	3204	1,847	5918	5986
Eieralbumin	3176	1,806	5735	5853
Fleischfaser	3288	1,740	5721	5639
Blutfibrin	3165	1,781	5637	5772
Vitellin	3298	1,742	5745	5646
Kasein	3265	1,795	5858	5818
Syntonin	3244	1,821	5908	5902
Pepton	3285	1,613	5299	5228
Mittel	3241	—	—	—
Chondrin	3233	1,587	5131	5128
Ossein	3214	1,568	5040	5066
Elastin	3240	1,840	5961	5945
Wollfaser	3236	1,703	5510	5502
Mittel	3231	—	—	—

Liegen Substanzgemenge vor, deren Zusammensetzung annähernd bekannt ist, wie Nahrungsmittel und die mit Harn und Kot entleerten Zersetzungsprodukte, so läßt sich die Größe K nach folgender Formel berechnen:

$$K = \frac{a_1 z_1 k_1 + a_2 z_2 k_2 + \dots}{a_1 z_1 + a_2 z_2 + \dots},$$

in der $a_1 a_2 \dots$ die relativen Mengen der einzelnen Stoffgruppen, $z_1 z_2 \dots$ die jeder Stoffgruppe zukommende Sauerstoffkapazität und $k_1 k_2 \dots$ die Werte von K für dieselbe bedeutet.

Die für die Nahrungsmittel in Betracht kommenden Standardzahlen sind nach Voit:

	k in g-Kal.	O ₂ -Kapazität
Pflanzeneiweiß	3298	1,740
Tierisches Eiweiß	3273	1,721
Fett	3271	2,863
Kohlehydrate	3525	1,156

Liegt z. B. eine Mischung von a_1 g Eiweiß und a_2 g Kohlehydraten (Reis) vor, so ist

$$\begin{aligned} k_1 &= 3,30 & z_1 &= 1,74 \\ k_2 &= 3,53 & z_2 &= 1,16. \end{aligned}$$

Setzt man $a_1 + a_2 = 100$ und $a_2 = 100 - a_1$, so erhält man

$$k = \frac{574,2 - 1,647 a_2}{174,0 - 0,58 a_2},$$

worin a_2 die in 100 g enthaltene Menge Kohlehydrate bedeutet. Setzt man nun der Reihe nach für a die Werte 0, 20, 40, 60, 80, 100, so erhält man für k die nachstehenden Zahlen:

g . .	0%	20%	40%	60%	80%	100%
k . .	3,30	3,33	3,37	3,42	3,47	3,53.

Es ist ersichtlich, daß ein Zuwachs von 20 Proz. Kohlehydraten den Quotienten nur um 0,03 bis 0,06 Kal., d. h. um 0,9 bis 1,8 Proz. ändert. Da die Quotienten aller übrigen in Frage kommenden Stoffe einander viel näher stehen als diejenigen von Eiweiß und Kohlehydraten, so wird eine Änderung des Mischungsverhältnisses, wenn der Gehalt an Kohlehydraten gleich bleibt, noch einen viel geringeren Einfluß auf den mittleren Quotienten ausüben (O. Krummacher¹⁾).

Im Jahre 1883 berechnete A. Lilienfeld²⁾ nach Zuntz³⁾ die Wärmemenge, die 1 g Kohlensäure gibt, entstanden aus Verbrennung von Eiweiß, dann aus Fett, dann aus Kohlehydraten, und die andererseits 1 g Sauerstoff liefert, indem es zur Oxydation der genannten Substanzen dient.

¹⁾ O. Krummacher, Über den Brennwert des Sauerstoffs. Zeitschr. für Biol. **44**, 362 (1903).

²⁾ A. Lilienfeld, Untersuchungen über den Gaswechsel fiebernder Tiere. Pflügers Archiv **32**, 337 (1883).

³⁾ N. Zuntz, Landw. Jahrb. **1879**, 65.

1 g Eiweiß enthält

0,535 g C 0,071 g H 0,156 g N 0,238 g O

es bilden sich daraus

0,334 g Harnstoff mit 0,067 g C 0,022 g H 0,156 g N 0,089 g O

somit bleiben noch . 0,468 g C 0,049 g H — 0,149 g O

die 0,149 g O brauchen

zur Bildung von H₂O — 0,019 g H — —

dann bleiben 0,468 g C 0,030 g H — —

Zur Verbrennung dieser Menge C zu CO₂ sind nötig

$$\frac{0,468 \cdot 32}{12} = 1,248 \text{ g O.}$$

Zur Verbrennung dieser Menge Wasserstoff zu H₂O sind nötig

$$\frac{0,030 \cdot 16}{2} = 0,240 \text{ g O.}$$

Es sind also zur Verbrennung von 1 g Eiweiß nötig 1,488 g O, während zugleich entstehen 1,248 + 0,468 = 1,716 g CO₂.

Da aus 1 g Eiweiß 0,334 g Harnstoff entsteht, d. h. ein Drittel des Eiweißes den Körper als Harnstoff verläßt, da ferner die Verbrennungswärme des Eiweißes 2,350 Kal. (zu niedrig) ist, so entspricht dem aus 1 g Eiweiß entstehenden Harnstoff eine Wärmemenge von $\frac{2,350}{3} = 0,783$ Kal. Zieht man nun diese Menge von 5,890 (Mittel

der für Kasein und Fibrin von Danilewski gefundenen Brennwerte) ab, so bleiben als wahrer Verbrennungswert des Eiweißes **5,107** Kal.

Aus 1 g Eiweiß entsteht 1,716 g CO₂, also entspricht der Bildung von 1 g CO₂ aus Eiweiß die Bildung von

$$\frac{5,107}{1,716} = 2,974 \text{ Kal.}$$

Zur Verbrennung von 1 g Eiweiß ist 1,488 g O nötig, also entspricht dem Verbrauch von **1 g O** zur Verbrennung von Eiweiß die

Bildung von $\frac{5,107}{1,488} = 3,432$ Kal.

Lilienfeld ermittelte auf ähnliche Weise folgende Werte:

	Bildung von 1 g CO ₂ entspricht	Verbrauch von 1 g O entspricht
Eiweiß	2,974 Kal.	3,432 Kal.
Fett	3,453 „	3,368 „
Traubenzucker	2,687 „	3,695 „
Stärke	2,751 „	3,783 „
Rohrzucker	2,703 „	3,717 „

Diese Werte berechtigen, die Sauerstoffaufnahme als proportional der Wärmebildung zu setzen. (Die Zahlen sind nicht absolut einwandfrei, da Lilienfeld der Berechnung die nach den älteren Methoden gewonnenen Verbrennungszahlen zugrunde legt.)

Zuntz und Hagemann¹⁾ wenden folgendes Rechnungsverfahren an. Der Brennwert des Eiweißes ist 5,711 Kal. (Stohmann) für 1 g bei 52,64 Proz. C, 7,08 Proz. H, 16 Proz. N, 1,03 Proz. S, 23,12 Proz. O.

1 g N im Eiweiß entspricht also einer Wärmemenge von 35,694 Kal. Unter der Annahme, daß der ganze Kohlenstoff und Stickstoff eines Pferdeharns mit 172,7 g C und 113,1 g N nur als Harnstoff und Hippursäure vorhanden seien, kann man, da im Harnstoff N:C = 7:3 und in der Hippursäure N:C = 7:54 ist, die folgende Gleichung aufstellen:

$$\frac{54}{7} x + \frac{3}{7} (113,1 - x) = 172,7.$$

Aus dieser Gleichung berechnet sich der in Hippursäure enthaltene Stickstoff zu 17,05 g und im Harnstoff zu 96,05 g.

Der Verbrennungswert von 1 Molekül = 179 g Hippursäure ist nach Berthelot 1012,9 Kal., nach Stohmann 1014,5 Kal., der von Harnstoff ist pro 60 g 151,5 Kal. bzw. 152,2 Kal. Also entspricht 1 g N aus Hippursäure 72,407 Kal., aus Harnstoff 5,423 Kal.

Hiernach berechnet sich der Verbrennungswert der Hippursäure mit 17,05 g auf 1234,5 Kal., jener des Harnstoffs mit 96,05 g N auf 520,9 Kal., in Summa 1755,4 Kal., entsprechend 113,1 g N im Harn. 1 g N im Harn entspricht dann ein Verbrennungswert von $\frac{1755,4}{113,1} = 15,521$ Kal. Das in der Nahrung resorbierte Eiweiß lieferte also auf je 1 g Stickstoff, der im Harn wieder erscheint, dem Körper eine Energiemenge = 35,694 — 15,521 = 20,173 Kal.

Eine Kontrolle dieses Rechnungsverfahrens bietet ein von Kellner mit zwei Ochsen ausgeführter Versuch. Er bestimmte nicht nur den Stickstoff- und Kohlenstoffgehalt des Harns, sondern auch den Brennwert und fand folgende Zahlen für den Tagesharn:

	Versuch I	Versuch II
Stickstoff.	61,28 g	46,63 g
Kohlenstoff.	203,20 g	161,30 g
Verbrennungswärme .	1945,00 Kal.	1549,40 Kal.
Hippursäure	145,00 g	126,40 g

Bei Anwendung ihres Rechnungsverfahrens fanden Zuntz und Hagemann:

Versuch I: 24,285 g N in Hippursäure entsprechen	1758,4 Kal.
36,995 g N im Harnstoff entsprechen	200,6 „
im ganzen	1959,0 Kal. ber.
von Kellner gefunden .	1945,0 „

¹⁾ Zuntz und Hagemann, Untersuchungen über den Stoffwechsel des Pferdes bei Ruhe und Arbeit. 1898.

Versuch II: 19,396 g N in Hippursäure entsprechen	1404,4 Kal.
27,234 g N im Harnstoff entsprechen	147,7 „
im ganzen	1552,1 Kal. ber.
von Kellner gefunden .	1549,4 „

B. Mineralstoffe.

Neben den organischen sind auch die anorganischen Substanzen oder Mineralstoffe im tierischen und pflanzlichen Organismus weit verbreitet und sind für die normale Zusammensetzung der Organe und Gewebe, wie auch für den normalen Verlauf der Lebensvorgänge ebenso notwendig. So gibt es kein tierisches Gewebe und keine tierische Flüssigkeit, die nicht Mineralstoffe enthalten, und es findet auch zwischen den Geweben und Mineralstoffen eine gewisse regelmäßige Verteilung statt, wie dies z. B. aus der Verteilung der Alkaliverbindungen ersichtlich ist: die Natriumverbindungen kommen hauptsächlich in den Säften, die Kaliumverbindungen in den Formelementen vor.

Die in den Zellen der Pflanzen und Tiere regelmäßig vorkommenden unverbrennlichen Stoffe sind: Kalium, Natrium, Kalzium, Magnesium, Eisen, Aluminium, Mangan, Phosphorsäure, Schwefelsäure, Kieselsäure und Chlor, außerdem begegnet man in manchen Zellen auch Jod und Arsen.

C. Untersuchung der Nährstoffe.

Vorbereitung und Probeentnahme der Nahrungsstoffe für die Untersuchung.

Die entnommene Probe muß einen guten Durchschnitt der ganzen zur Anwendung gelangenden Menge des Stoffes bilden. Die für die Stoffwechselversuche an Menschen und Tieren angewandten Nahrungs- und Futtermittel sind verschiedener Konsistenz, und zwar: flüssiger, breiiger, feuchtfester und lufttrockner. Handelt es sich um flüssige oder sirupartige Massen, so muß man gut umschütteln und davon einen aliquoten Teil entnehmen; ist die Flüssigkeit in mehrere Gefäße verteilt, so entnimmt man jedem nach kräftigem Durchschütteln einen geringen Anteil, vereinigt sämtliche Anteile in einer Flasche, schüttelt gut durch und erhält auf solche Weise einen guten Durchschnitt. Dickbreiige und pastenartige Massen müssen sorgfältig mit einem Löffel oder Spatel umgerührt werden.

Bei feuchtfesten Massen, wie Obst, Kartoffeln, Wurzelgewächs usw., muß man sich nach der Größe richten, indem man eine gleich große Zahl mittlerer und kleiner Exemplare aussucht und diese ganz oder von jedem nur einen bestimmten Teil verarbeitet. Man zerschneidet nun je nach Bedarf 1—2 Pfund von den so ausgesuchten Exemplaren in dünne Scheiben, wägt, breitet sie auf einem flachen Porzellanteller oder einer Glasplatte aus und trocknet sie unter öfterem Umwenden bei 50—60° C. Hierauf läßt man sie einige Stunden bei Zimmertemperatur liegen, wägt wieder, zerkleinert und zerreibt die Stücke in einer Reibschale oder in einer Mühle so, daß sie durch ein 1-mm-Sieb durchgehen. Das so erhaltene Pulver kann für die Untersuchung verwendet werden, wobei man nicht außer acht lassen darf, die in diesem Pulver erhaltenen Werte auf die ursprüngliche frische Substanz, d. h. mit dem vollen Wassergehalt umzurechnen (s. unter Trockensubstanz). Gemüse, Salat wird in derselben Weise behandelt, indem man eine Anzahl Pflanzen oder Pflanzenteile sorg-

fältig aussucht, mittels eines scharfen Messers, einer Schere oder Schneidemaschine fein zerschneidet, gut durchmischt und davon 1—2 Pfund abwägt. Fleisch, Wurst usw. wird mit einem Messer in kleine Stücke geschnitten oder durch eine Fleischmaschine durchgelassen.

Bei fetthaltigen Substanzen, wie z. B. bei fettreichem Fleisch, Wurst, Käse, Speck usw. tritt beim Vortrocknen Fett aus, das sich dann mit der Hauptmenge der Substanz nicht gut vermischen läßt, ungleichmäßig verteilt ist, und man erhält eine inhomogene Masse. In solchen Fällen empfiehlt es sich am besten, das Fleisch resp. den Käse in kleine Stücke zu zerschneiden, diese in einer mit Glasstöpsel verschließbaren Flasche mit einem Gemisch von gleichen Teilen Alkohol und Äther zu übergießen und unter öfterem Umschütteln bei Zimmertemperatur bis zum nächsten Tage stehen zu lassen, um den größten Teil des Fettes zu entfernen und die Substanz auf solche Weise leicht pulverisierbar zu machen. Hierauf gießt man den Alkohol-Äther ab, wäscht den Rückstand durch Dekantieren mit Äther ein- bis zweimal nach. Der Äther-Alkohol wird verdunstet, der Rückstand getrocknet, in wasserfreiem Äther gelöst, vom ungelösten abfiltriert, der Äther verdunstet, der Rückstand bei etwa 100° C getrocknet, im Exsikkator über Schwefelsäure erkalten gelassen und gewogen; man erhält auf diese Weise die Menge des kalt extrahierten Fettes. Das Ungelöste wird zum kalt entfetteten Rückstand zugesetzt, das Ganze bei 50—60° C getrocknet, an der Luft liegen gelassen, gewogen und dann pulverisiert. Die oben erhaltene Menge Fett + Gewicht des lufttrockenen, kalt entfetteten Rückstandes ergibt die Menge lufttrockener Substanz.

Bei Grün- und Rauhfutter, Sauerfutter, Preßfutter, Schnitzel usw. nimmt man aus dem gesamten Vorrat von verschiedenen Stellen mehrere Einzelproben, mischt gut durch, zerschneidet zu feinem Häcksel, mischt den Häcksel sorgfältig durch, wägt, breitet ihn auf einer Papierunterlage in dünner Schicht aus und trocknet im Lufttrockenschrank bei 50—60° C, bis die Masse spröde und bröcklig geworden ist, so daß man sie mit der Schrotmühle mahlen kann. Nachdem das so erhaltene Futter einige Stunden an der Luft gelegen hat, wägt man wieder und erhält die Menge der lufttrockenen Substanz, die dann pulverisiert wird.

Bestimmung des Wassers bzw. der Trockensubstanz

Bei allen quantitativen chemischen sowie physikalischen Untersuchungen kommt der Wassergehalt der zu untersuchenden Substanz in erster Linie in Betracht, weil von ihm das quantitative Verhältnis der einzelnen Bestandteile abhängig ist, insofern als fast alle Stoffe, mit wenigen Ausnahmen, die Fähigkeit besitzen, je nach den Verhältnissen Wasser aufzunehmen oder zu verlieren. So wissen wir z. B., daß viele Salze sowie wasserhaltige organische Substanzen beim Liegen an der Luft Wasser aufnehmen, andere wiederum in trockener Luft oder in Gegenwart von wasserentziehenden Mitteln, wie konzentrierte Schwefelsäure usw., Wasser verlieren. Man kann also in ein und derselben, aber verschieden aufbewahrten Substanz voneinander differierende Mengen der anderen Bestandteile erhalten.

Man bestimmt gewöhnlich den Wassergehalt einer Substanz indirekt, indem man deren Gewichtsverlust durch Trocknen bei 100—105° C ermittelt oder direkt, indem man die von der Substanz beim Trocknen abgegebene aufgefangene Menge Wasser wägt.

I. Stickstoff.

Quantitative Bestimmung. Zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs dienen die Methoden von Dumas, Will-Warentrap (s. Elementaranalyse) und Kjeldahl. Die erste Methode kann in jedem Falle angewendet werden, sie ist aber umständlich und findet nur in solchen Fällen Anwendung, in denen die letzteren versagen, wie bei Nitro-, Diazo- und einigen anderen Körpern, ferner bei Pyridin und Cholinderivaten.

Das Verfahren von Kjeldahl.

Das Prinzip ist folgendes: Die abgewogene oder gemessene organische Substanz wird mit konzentrierter Schwefelsäure und einem sauerstoffübertragenden Mittel, wie metallisches Quecksilber, metallisches Kupfer oder bei leicht aufschließbaren Substanzen, wie z. B. Harn, auch Kupfersulfatlösung, so lange erhitzt, bis sie völlig verbrannt, d. h. wasserklar geworden ist. Der Stickstoff ist dann in schwefelsaures Ammon übergeführt. Dies wird durch Kalilauge zerlegt, das Ammoniak überdestilliert, in einer abgemessenen Menge $\frac{1}{10}$ Normalschwefelsäure aufgefangen und der Überschuß mit $\frac{1}{10}$ Normalkalilauge zurücktitriert.

Zur Verbrennung der Substanz ist für die Beförderung der Aufschließung eine Reihe von Zusätzen zu der konzentrierten Schwefelsäure vorgeschlagen worden. So empfiehlt Wilfahrt eine Mischung von 4 Volumen konzentrierter und 1 Volumen rauchender Schwefelsäure und auf einen Liter dieser Mischung 100 g Phosphorsäureanhydrid oder eine Mischung von 3 Volumen konzentrierter und 2 Volumen rauchender Schwefelsäure. Kellner verwendet 200 g Phosphorsäureanhydrid auf 1 Liter konzentrierte Schwefelsäure. Arnold setzt zur Schwefelsäure für jede Aufschließung 0,05 g Kupferoxyd und 1 g Quecksilber. Ulsch setzt statt Quecksilber fünf Tropfen Platinchloridlösung. Nach Gunning soll die Aufschließungsflüssigkeit 1 Teil Kaliumsulfat in 2 Teilen konzentrierter Schwefelsäure enthalten, während Wohltmann 5–10 g Kaliumsulfat und einen Tropfen Quecksilber auf 25 ccm Schwefelsäure anwendet.

Ein bestimmtes Quantum der zu untersuchenden Substanz wird in einen starken, schwer schmelzbaren trockenen Kaliglasrundkolben, sog. Kjeldahlkolben, gebracht, 10–20 ccm konzentrierter reiner Schwefelsäure (je nachdem die Substanz leichter oder schwerer sich oxydiert) und etwas von den obengenannten Sauerstoffüberträgern zugesetzt. Dies Gemisch wird auf dem Drahtnetz so lange vorsichtig erhitzt, bis die erst sich abscheidenden Kohlenmassen völlig verbrannt sind und das Produkt sich als eine farblose oder schwach grüne, klare Flüssigkeit repräsentiert. Man muß darauf achten, daß die Substanz, besonders eine pulverförmige, vor dem Erhitzen vollkommen mit der Oxydationsflüssigkeit durchfeuchtet ist und sich im Gemisch

keine trockenen Klümpchen finden. Die im Halse des Kolbens beim Einfüllen haftengebliebenen Substanzteilchen werden beim Eingießen der Säure unter Schräghalten des Kolbens mit hineingespült. Bei der Verbrennung setzen sich oft im oberen gewölbten Teile des Kolbens halbverkohlte Massen ab, die durch Umschwenken losgelöst werden. Bei manchen Substanzen gelingt aber das nicht, und es empfiehlt sich dann, nach dem Erkalten des Kolbens, mit Wasser abzuspielen und weiter zu erhitzen.

Am schnellsten geht das von Atterberg¹⁾ modifizierte Gunning'sche Aufschließungsverfahren vonstatten. Man erhitzt 1—2 g Substanz mit 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz eines Tropfens Quecksilber bis zur Lösung, fügt dann 15—18 g reines stickstofffreies Kaliumsulfat hinzu und erhitzt weiter, bis das Gemisch farblos geworden ist, worauf man das Erhitzen noch 15 Minuten fortsetzt. Nach dem Erkalten verdünnt man mit 250 ccm Wasser.

Nach dem vom Verband der Versuchsstationen angegebenen Verfahren wird bei Bestimmung des Stickstoffs in Substanzen, die organischen Stickstoff enthalten, 1—2 g Substanz mit 20 ccm einer 200 g Phosphor und einen Tropfen Quecksilber im Liter enthaltenden Schwefelsäure, bei schäumenden Substanzen unter Zusatz von etwas Paraffin erhitzt, bis die Flüssigkeit farblos ist; nur in Gegenwart größerer Mengen von Eisenverbindungen erscheint die Lösung schwach hellgelb.

Nun läßt man die Oxydationsflüssigkeit erkalten und setzt ganz vorsichtig unter Kühlung mit Wasser destilliertes Wasser zu, bis das Gemisch genügend verdünnt ist (etwa die zwanzigfache Menge), und bringt es nun quantitativ in einen Literkolben, indem man wiederholt mit destilliertem Wasser aus einer Spritzflasche nachwäscht. Der Literkolben darf nicht viel über $\frac{1}{3}$ gefüllt sein. Nun setzt man 1—2 Zinkspiralen zu, die das Stoßen beim Kochen vorzüglich verhindern, einige Kristalle Natriumthiosulfat oder 20 bis 25 ccm Kaliumsulfidlösung (40 g im Liter) zur Ausfällung des Quecksilbers resp. Kupfers, wobei die Flüssigkeit meist schwarz wird, läßt dann 40—80 ccm 33 prozentige reine Kalilauge durch einen Trichter an der Kolbenwand zufließen und destilliert.

Der dazugehörige Apparat (Fig. 1), der natürlich vor dem Zusatz von Kalilauge völlig gebrauchsfertig sein muß (da sofort beim Zusatz von KOH die Ammoniakentwicklung beginnt), besteht aus einem auf den Kolben luftdicht schließenden durchbohrten Kautschukstopfen, der mittels einer birnenförmigen Röhre mit einem Liebigschen Kühler verbunden ist. Am anderen Ende wird der Kühler mittels einer Kugelhöhre mit der Vorlage (einem Erlenmeyerkolben) verbunden. Die Destillation wird vielfach ohne Kühlung ausgeführt. Die Vorlage ist beschickt mit 25—50 ccm $\frac{1}{10}$ Normal-schwefelsäure und etwa der doppelten Menge destillierten Wassers.

¹⁾ Chemiker-Zeitung 1898, 565.

Die Destillation dauert 25—30 Minuten. Die Kalilauge zersetzt das Ammoniaksulfat, macht das Ammoniak frei, das nun übergetrieben wird und sich mit der Normalschwefelsäure in der Vorlage verbindet.

Das Ende des Prozesses wird dadurch nachgewiesen, daß man das Rohr am Kühler lüftet und mit einem Stückchen feuchten roten Lackmuspapiers die Reaktion prüft. Ist diese neutral, so geht kein Ammoniak mehr über, der Prozeß ist beendet.

Vor allem muß man sich davor hüten, daß nicht die Flüssigkeit im Kolben aufkocht und Flüssigkeitspartikelchen in die Vorlage überspritzt werden. Ein Tropfen Kalilauge in den Kühler — und die Analyse ist wertlos. Um das beim Destillieren unter Umständen ein-

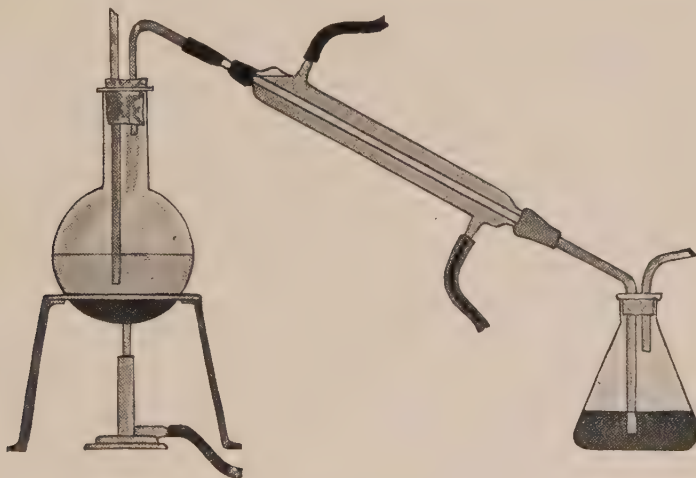


Fig. 1.
Destillationsapparat nach Kjeldahl.

tretende Schäumen, das von Seifen flüchtiger Fettsäuren herrührt, zu verhindern oder wenigstens abzuschwächen, empfiehlt es sich, etwas Kalziumchlorid zuzusetzen (Grégoire und Carpiaux)¹⁾.

Ist die Destillation beendet, so nimmt man erst die Vorlage ab und dreht dann die Flamme aus, da sonst Gefahr vorhanden ist, daß die Flüssigkeit zurücksteigt.

Man spült nun das Rohr der Vorlage sorgfältig mit destilliertem Wasser ab, setzt dann 3—4 Tropfen Rosolsäure oder Kongorot zu und titriert mit $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge oder Kalilauge. Die Differenz zwischen der angewendeten und der überschüssigen Schwefelsäure entspricht dem Gehalt an Ammoniak. Verbraucht man beim Titrieren z. B. 35 ccm $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge, so sind $50 - 35 = 15$ ccm $\frac{1}{10}$ Normalsäure vorher schon an Ammoniak gebunden gewesen. Nun entspricht jedem Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$ Säure

¹⁾ A. Grégoire und A. Carpiaux, Zeitschr. f. Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel 7, 282 (1904).

0,0014 g Stickstoff oder

0,0017 g Ammoniak

(14 = Atomgewicht des Stickstoffs, 17 = Molekulargewicht des Ammoniaks NH_3 ; entspricht einem Liter Normalsäure oder 10 Liter $\frac{1}{10}$ Normalsäure).

Daraus läßt sich also der Stickstoffgehalt leicht berechnen.

1. Bestimmung der Stickstoffsubstanz (Rohproteine).

Die Menge der in den Nahrungs- und Futtermitteln enthaltenen Rohproteine erhält man aus dem Gesamtstickstoffgehalt durch Multiplikation mit dem Faktor 6,25, der sich bei der Annahme eines mittleren Stickstoffgehaltes von 16 Proz. ergibt ($\frac{100}{16} = 6,25$). Der so ermittelte Wert stellt nur einen annähernden Ausdruck für den Prozentgehalt der Nahrungs- und Futtermittel an wirklichen Proteinen dar, weil sie außer den Proteinen noch andere Stickstoffverbindungen, wie Amide, Ammoniak, Alkaloide, Salpetersäure usw. enthalten, die sich nicht nur durch ihren abweichenden prozentualen Stickstoffgehalt, sondern auch durch ihren Nährwert unterscheiden. Besonders schwankend haben sich die pflanzlichen Proteine nach den Untersuchungen von Ritthausen¹⁾ u. a. erwiesen; es wurden Werte zwischen 16,38 und 18,73 Proz. Stickstoff gefunden. Ritthausen empfiehlt, folgende von ihm für die einzelnen Gruppen der Samen ermittelten Faktoren der Proteinberechnung zugrunde zu legen.

	Mittlerer Stickstoff- gehalt der Proteine	Protein- faktor
1. Gerstenkörner, Gerstenmehl, Gerstentreber, Mais, Buchweizen, weiße Bohnen, Sojabohne, Raps- und Rübsenpreßrückstand	% 16,66	6,00
2. Weizenkörner, Weizenfuttermehl, Weizenkleie, Roggenkörner, Roggenfuttermehl, Roggenkleie, Haferkörner, Hafermehl, Erbsen, Saubohnen, Wicken, Preßrückstände von Lein-, Hanf-, Erdnuß- und Baumwollsamensamen, süße und bittere Mandeln, Haselnüsse und Paranüsse, Rizinussamen, Aprikoskerne, Kürbiskerne, Wallnüsse, Kokosnuß, Sesamsamen, Sonnenblumensamen und Lupinen. . . .	17,60 18,20	5,70 5,50

2. Quantitative Bestimmung der Eiweißkörper (Reinproteine).

Kochprobe. Diese besteht darin, daß man der eiweißhaltigen Flüssigkeit 1—2 Proz. Kochsalz zusetzt oder bei hohem Eiweißgehalt mit einer genügenden 1—2 prozentigen Kochsalzlösung verdünnt und mit Essigsäure genau neutralisiert. In kleinen abgemessenen Portionen der neutralisierten Flüssigkeit bestimmt man dann die Menge

¹⁾ H. Ritthausen, Landwirtsch. Versuchsstationen 47, 391 (1896).

Essigsäure, die der vorher im Wasserbade erhitzten Portion zugesetzt werden muß, damit die Ausscheidung des Eiweißes so vollständig werde, daß das Filtrat mit der Hellerschen Probe keine Eiweißreaktion gibt. Hierauf erhitzt man eine abgewogene oder abgemessene größere Flüssigkeitsmenge im Wasserbade, setzt dann allmählich unter Umrühren die berechnete Menge Essigsäure zu und erhitzt noch einige Zeit. Man filtriert dann, wäscht den Niederschlag mit Wasser aus, extrahiert ihn mit Alkohol und mit Äther, trocknet, wägt, verascht und wägt wieder. Das Filtrat darf keine Reaktion mit der Hellerschen Probe geben. Diese Methode eignet sich für die meisten Fälle und besonders dann, wenn man das Filtrat für andere quantitative Bestimmungen verarbeiten will.

Alkoholfällung. Man neutralisiert zuerst die Flüssigkeit, fügt nötigenfalls etwas Kochsalzlösung hinzu und versetzt mit so viel Alkohol, daß die Lösung 70—80 Volumprocente enthält, wobei ein Niederschlag entsteht, der nach 24 Stunden abfiltriert, mit Alkohol und Äther extrahiert, getrocknet und gewogen wird, der Rückstand wird verascht und die Asche gewogen. Die Flüssigkeit darf keine in Alkohol unlöslichen Substanzen, wie z. B. Glykogen, enthalten.

In den nach diesen beiden Methoden enthaltenen Filtraten bleiben oft noch geringe Mengen Eiweiß gelöst, die man in der Weise bestimmt, daß man die Filtrate stark einengt, das etwa vorhandene Fett durch Ausschütteln mit Äther entfernt und die fettfreie Lösung mit Gerbsäurelösung fällt. Der entstandene, mit Wasser gewaschene Niederschlag enthält rund 63 Proz. Eiweiß.

Gerbsäurefällung. Gute Resultate erlangt man oft bei der Fällung des Gesamteiweißes mit Gerbsäure und Bestimmung des Stickstoffgehaltes nach Kjeldahl. Die Multiplikation des Stickstoffwertes mit 6,25 gibt die Eiweißmenge an.

Kochprobe mit Essigsäure. Zur Abscheidung der nativen Eiweißstoffe aus Flüssigkeiten kocht man diese mit verdünnter Essigsäure, bis eine gute flockige Gerinnung erreicht ist. Da Albuminstoffe in überschüssiger Essigsäure löslich sind, muß man mit dem Zusatz der Säure vorsichtig verfahren. Kleine, in Lösung gebliebene Reste von Eiweiß, sowie etwa vorhandenes Azidalbumin und Alkalialbuminat werden nach Hofmeister durch Kochen mit frisch gefälltem Bleikarbonat oder mit Ferriazetat entfernt. Muß das Kochen vermieden werden, so fällt man das Eiweiß durch vorsichtigen Zusatz von Bleiazetat oder Alkohol. Enthält die Flüssigkeit durch Alkohol fällbare Stoffe, wie das Glykogen, so entfernt man das Eiweiß durch abwechselnden Zusatz von Kaliumquecksilberjodid und Salzsäure oder auch mit Trichloressigsäure.

Fällung mit essigsaurem Eisenoxyd. Nach Hoppe-Seyler wird die nur wenig Essigsäure enthaltende Flüssigkeit mit einer Lösung von essigsaurem Eisenoxyd in genügender Menge oder mit einer Mischung von Eisenchlorid und überschüssigem Natriumazetat versetzt, zum Kochen erhitzt und das Kochen so lange er-

halten, bis sich das basische Salz des Eisenoxyds vollständig ausgeschieden hat.

Über die Abscheidung des Eiweißes siehe Blut, Harn, Milch.

Kupferhydroxydverfahren von A. Stutzer. Man übergießt 1—2 g der fein gepulverten Substanz in einem Becherglas mit 100 ccm Wasser, erhitzt zum Sieden oder erwärmt bei stärkehaltigen Stoffen 10 Minuten im Wasserbade und versetzt mit 0,3—0,4 g aufgeschlämmtem Kupferhydroxyd. Nach dem Erkalten filtriert man durch ein schwedisches Faltenfilter, wäscht den Niederschlag mit Wasser aus, verbrennt ihn noch feucht nach Kjeldahl und bestimmt den Stickstoffgehalt.

Eine haltbare Kupferoxydaufschlammung bereitet man in der Weise, daß man 100 g Kupfersulfat in 5 Liter Wasser löst, 2,5 g Glycerin zusetzt und die Lösung mit verdünnter Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion versetzt, wodurch das Kupfer als Hydroxyd ausfällt. Dieses wird abfiltriert und durch Verrühren mit glyzerinhaltigem Wasser (5 g pro Liter) aufgeschlämmt, durch wiederholtes Dekantieren und Filtrieren von den letzten Spuren Alkali befreit, der Rückstand mit (10 Proz.) glyzerinhaltigem Wasser verrieben und bis zu einer gleichmäßigen, mit einer Pipette aufsaugbaren Masse verdünnt. Den Gehalt dieser Masse an Kupferhydroxyd bestimmt man durch Eindunsten eines abgemessenen Volumens und Glühen des Rückstandes. Diese Aufschlammung wird in etwa 150 ccm fassenden, vollgefüllten, luftdicht verschließbaren Flaschen an einem dunklen und kühlen Ort aufbewahrt.

Um die Bildung von phosphorsaurem Kupfer und freiem löslichen Alkali bei der Fällung alkaliphosphatreicher Substanzen zu verhindern, fügt man einige Kubikzentimeter Alaunlösung hinzu, wodurch die gelösten Phosphate unter Bildung unlöslicher phosphorsaurer Tonerde zersetzt werden.

Bei alkaloidhaltigen Stoffen erhitzt man 1—2 g in einem Becherglase mit 100 ccm absolutem Alkohol und 1 ccm Essigsäure im Wasserbade zum Sieden, wobei ein Niederschlag entsteht, von dem nach dem Absetzen vorsichtig abfiltriert wird, so daß nur geringe Mengen auf das Filter geraten. Das gelöste Fett wird durch Auswaschen mit warmem Alkohol und Äther entfernt, der Rückstand im Becherglase mit 100 ccm Wasser erhitzt oder bei stärkemehlhaltigen Stoffen 10 Minuten auf dem Wasserbade erwärmt und weiter verfahren, wie oben angegeben ist.

Das Verfahren von Barnstein¹⁾ besteht darin, daß man 1—2 g Substanz mit 50 ccm destilliertem Wasser aufkocht oder bei stärkemehlhaltigen Stoffen 10 Minuten auf dem Wasserbade erwärmt, darauf mit 25 ccm einer 6prozentigen Kupfersulfatlösung und unter Umrühren mit 25 ccm einer 1,25prozentigen Natronlauge versetzt. Der dabei entstehende grünliche Niederschlag wird, nachdem man die darüberstehende Flüssigkeit abgossen, mehrmals mit Wasser

¹⁾ F. Barnstein, Landwirtschaftl. Versuchsstationen 54, 327 (1900).

dekantiert, auf das Filter gebracht und mit warmem Wasser so lange ausgewaschen, bis das ablaufende Wasser mit gelbem Blutlaugensalz oder Chlorbarium nicht mehr reagiert. Der Stickstoffgehalt dieses Niederschlages wird nach Kjeldahl ermittelt.

Methode von Schjerning¹⁾. 0,5—1,0 g des Futtermittels übergießt man in einem Becherglas mit 100 ccm destilliertem Wasser und läßt unter öfterem Umrühren etwa 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Hierauf erwärmt man in einem Wasserbade auf 50° C, versetzt mit 20—40 ccm einer gesättigten Uranazetatlösung und läßt die Mischung, vor direktem Licht geschützt, unter öfterem Umrühren etwa ½ Stunde bei 50° C stehen, wobei sich ein Niederschlag ausscheidet, der auf ein mit Flußsäure ausgezogenes Filter gebracht und zwei- bis dreimal mit einer kalten, 1—2prozentigen Uranazetatlösung nachgewaschen wird. Nun bringt man den Niederschlag in einen 50 ccm Magnesiamilch (11 g MgO in 2 Liter Wasser) enthaltenden Kolben, kocht, dampft auf einer Asbestplatte bei kleiner Flamme fast zur Trockne ein und bestimmt im Rückstand den Stickstoff nach Kjeldahl. Als Korrektur für die Löslichkeit der Uranfällung sind für je 100 ccm Filtrat und Waschflüssigkeit 0,1 ccm einer 1/12 Normal-säure zu addieren.

Verdauliche Stickstoffsubstanz.

Verdauung mit künstlichem Magensaft. Man extrahiert 2 g von der zu untersuchenden fein pulverisierten Substanz mit Äther im Soxhletapparat bis zur vollständigen Entfettung, erkennbar daran, daß der Äther beim Verdunsten keinen Rückstand mehr hinterläßt, bringt die so entfettete Substanz mittels einer Federfahne quantitativ in ein Becherglas, übergießt mit 500 ccm Magensaft und läßt im Brutschrank 48 Stunden bei 37—40° C stehen, wobei man in den ersten Stunden alle 2 Stunden je 5 ccm einer 10prozentigen Salzsäure, d. h. 0,1 Proz. Salzsäure in Prozenten der Flüssigkeit, zusetzt, bis der Salzsäuregehalt der Mischung auf 1 Proz. gestiegen ist. Nun filtriert man die verdaute Flüssigkeit durch ein Asbestfilter ab, bringt das Ungelöste auf das Filter, wäscht mit warmem Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion, erkennbar daran, daß eine mit Salpetersäure angesäuerte Probe des Waschwassers auf Zusatz von etwas Silbernitrat keinen Niederschlag gibt, und bestimmt darin die Menge des Stickstoffs nach Kjeldahl. Dieser Wert, von der Gesamtmenge des Stickstoffs subtrahiert, gibt die Menge des verdaulichen Stickstoffs, aus der man durch Multiplikation mit 6,25 die Menge der verdaulichen Stickstoffsubstanz erfährt (A. Stutzer, O. Kellner²⁾).

¹⁾ H. Schjerning, Zeitschr. f. analytische Chemie **39**, 545 und 633 (1900).

²⁾ A. Stutzer, Journal f. Landwirtschaft **28**, 201 (1880); **29**, 475 (1881). Zeitschr. f. physiol. Chemie **9**, 211 (1885); **11**, 207 und 537 (1887). Landwirtschaftliche Versuchsstationen **36**, 321 (1889), **37**, 107 (1890). — O. Kellner, Landwirtschaftl. Versuchsstationen **44**, 188 (1894).

Die Herstellung des Magensaftes geschieht in der Weise, daß man die innere abgelöste Schleimhaut frischer, mit kaltem Wasser gewaschener Schweinemägen in kleine Stücke zerschneidet und pro Magen mit 5 Liter Wasser und 100 ccm einer 10prozentigen Salzsäure, sowie 2—3 g Salizylsäure versetzt, 1—2 Tage stehen läßt und die Flüssigkeit zuerst durch ein Flanelltuch und dann durch Papierfilter filtriert. Neuerdings hat Stutzer¹⁾ empfohlen, für jeden Versuch 250 ccm eines konzentrierten Magensaftes zu verwenden, der pro Magen nur 2,5 Liter Wasser mit 0,2 Proz. Salzsäure enthält, und als Konservierungsmittel so viel Chloroform zuzusetzen, daß ein Teil davon ungelöst bleibt.

Verdauung mit Pepsin-Salzsäure. Nach Sjollema²⁾ und Wedemeyer³⁾ übergießt man 2 g Substanz in einem Becherglase mit einer Lösung von 1 g Pepsin und 10 ccm einer 25prozentigen Salzsäure in 490 ccm Wasser, bedeckt das Becherglas mit einem Uhrglas und digeriert 48 Stunden lang unter öfterem Umrühren bei 37—40° C, wobei man nach 24 Stunden wieder 10 ccm der oben erwähnten Salzsäure zusetzt und weiter in derselben Weise, wie oben, verfährt.

3. Proteosen und Peptone.

Die quantitative Bestimmung der Proteosen und Peptone geschieht in der Weise, daß man 5—10 g der zu untersuchenden Substanz einige Zeit mit 200 ccm Wasser in einen 250 ccm fassenden Kolben schüttelt, bis zur Marke auffüllt und durch ein trocknes Filter filtriert. Gibt eine Probe des Filtrats beim Kochen unter Zusatz einiger Tropfen Salpetersäure eine Flockung, so fällt man in 50 oder 100 ccm des Filtrates das Albumin vollständig aus, filtriert und wäscht dieses aus und bestimmt darin den Stickstoffgehalt, aus dem man durch Multiplikation mit 6,25 die Menge Albumin erfährt. Das Filtrat wird dann zur Bestimmung der Proteosen und Peptone nach Bömer in folgender Weise behandelt.

Bestimmung der Proteosen. 50—100 ccm des Filtrats, beim Fehlen von Albumin, der ursprünglichen Flüssigkeit werden in einem Becherglase eingeeengt, mit Schwefelsäure angesäuert, um das Ausfallen von unlöslichen Zinksalzen wie Phosphaten usw. zu verhindern, und mit gepulvertem Zinksulfat in der Kälte gesättigt. Nach einigem Stehen scheiden sich die Proteosen an der Oberfläche der Flüssigkeit ab, die abfiltriert, mit kaltesättigter Zinksulfatlösung gut ausgewaschen werden. Der nach Kjeldahl ermittelte Stickstoffgehalt, mit 6,25 multipliziert, ergibt die Menge Proteosen.

Bei Gegenwart größerer Mengen Ammoniak fällt mit den Proteosen ein schwer lösliches Doppelsalz von Ammonium- und Zink-

¹⁾ A. Stutzer, *Journal für Landwirtschaft* **54**, 234 (1906).

²⁾ B. Sjollema, *Zeitschr. f. Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel* **2**, 413 (1899).

³⁾ K. Wedemeyer, *Landwirtschaftl. Versuchsstationen* **51**, 383 (1899).

sulfat aus, das durch Erhitzen des Niederschlages im Kjeldahlkolben, durch längeres Erhitzen mit Magnesiamilch zerstört wird; man bestimmt aber auch im Zinksulfatniederschlag einer anderen Portion der Proteoselösung den Ammoniakstickstoff durch Destillation mit Magnesia und zieht diesen vom Gesamtstickstoffgehalt des Zinksulfatniederschlages ab.

Bestimmung der Peptone. Um die Gegenwart von Peptonen festzustellen, versetzt man eine Probe, etwa 25 ccm, des mit Wasser auf 250 ccm aufgefüllten Filtrats von der Zinksulfatfällung mit so viel konzentrierter Natronlauge, bis der zuerst entstandene Niederschlag von Zinkhydroxyd wieder in Lösung gegangen ist, und fügt einige Tropfen einprozentiger Kupfersulfatlösung hinzu, wobei Peptone eine karminrote bis rotviolette Färbung zeigen. Nun versetzt man 100 ccm des auf 250 ccm aufgefüllten Filtrates der Zinksulfatlösung mit einer stark angesäuerten Lösung von phosphorwolframsaurem Natrium (man löst 120 g Natriumphosphat und 200 g Natriumwolframat im Liter Wasser und fügt 100 ccm verdünnte Schwefelsäure hinzu [1:3]), solange noch ein Niederschlag entsteht, und läßt bei Zimmertemperatur 12 Stunden stehen. Den Niederschlag wäscht man auf dem Filter mit verdünnter Schwefelsäure (1:3) aus, bestimmt den Stickstoffgehalt nach Kjeldahl und erhält durch Multiplikation dieses Wertes mit 6,25 die Menge Peptone.

II. Hydrolyse der Proteine mittels Säuren.

Isolierung der Mono- und Diaminosäuren.

Monoaminosäuren.

Die vollständige Spaltung der Proteine geschieht meistens durch rauchende Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 oder mit 25prozentiger Schwefelsäure, wobei man letztere dann bevorzugt, wenn es sich um die direkte Isolierung von Aminosäuren, wie z. B. Tyrosin, handelt. Zur Hydrolyse bringt man in einen genügend großen Rundkolben von der rauchenden Salzsäure das dreifache und von der Schwefelsäure das fünf- bis zehnfache Gewicht der angewandten Eiweißmenge und trägt unter beständigem Umschütteln die Substanz ein. Ist das Protein in diesen Säuren schwer löslich, so fügt man mehr Säure zu, quillt es auf, so erhitzt man es auf dem Wasserbade, bis Lösung eingetreten ist: löst es sich auch jetzt nicht, so wird es auf dem Ölbad weiter erhitzt. Bei Anwendung von Schwefelsäure tritt Lösung bald ein, wenn man das Protein zuerst bei Zimmertemperatur mit 70prozentiger Schwefelsäure übergießt und öfter umschüttelt. Hierauf verdünnt man die Lösung mit soviel Wasser, daß der Schwefelsäuregehalt 25 Proz. beträgt. Sobald Lösung eingetreten ist, erhitzt man die salzsaure Lösung 6 Stunden und die schwefelsaure etwa 16 Stunden, vom Beginn des Siedens gerechnet. Die Hydrolyse ist fertig, wenn die Reaktionsflüssigkeit keine Biuretteaktion mehr gibt. Absolut einwandfrei ist diese Probe nicht, weil man aminosäurehaltige Verbindungen kennt, die diese Reaktion nicht geben.

Dieselben Spaltungsprodukte, nur mit dem Unterschiede, daß sie optisch inaktiv sind, erhält man bei der Hydrolyse mit 20–33prozentiger Kali- oder Natronlauge oder mit einer heißgesättigten Barytlösung. Den Baryt entfernt man mit Schwefelsäure; bei Anwendung bestimmter Mengen Alkalilauge neu-

tralisiert man diese mit Salzsäure. Das Tyrosin scheidet sich durch Einengen der Lösung ab. Die übrigen Monoaminosäuren gewinnt man nach der Estermethode. Ferner lassen sich die Proteine mittels der proteolytischen Fermente, und zwar am besten durch Kombination von Pankreassaft und Darmsaft hydrolysieren, wobei die Isolierung der einzelnen Aminosäuren nach denselben Methoden erfolgen kann.

1. Darstellung der Esterchlorhydrate.

Die so erhaltene dunkelviolette Hydrolysenflüssigkeit wird von den ausgeschiedenen Huminsubstanzen durch ein engmaschiges Koliertuch abfiltriert, der dunkelbraun bis schwarz gefärbte Niederschlag so lange mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser farblos abläuft und das Filtrat dann in einem großen Destillationskolben unter vermindertem Druck eingedampft, wobei man bei der direkten Bestimmung der Glutaminsäure als salzsaures Salz nur einengt und die Lösung auf Eis aufbewahrt. Hierauf nutscht man das Glutaminsäurechlorhydrat ab, wäscht mit Salzsäure aus, engt die Mutterlauge bis zur Kristallisation ein und verdampft die Mutterlauge der letzten Abscheidung unter vermindertem Druck, nachdem man die Mutterlauge des umkristallisierten rohen Glutaminsäurechlorhydrats hinzugefügt hat, bis zum Sirup ab und unterbricht das Verdampfen, sobald der Sirup zähe Blasen wirft. Nun versetzt man den Rückstand sofort mit der dreifachen Menge seines Gewichtes an absolutem Alkohol, wobei der Kolben nicht mehr als $\frac{2}{3}$ gefüllt sein darf, und sättigt mit durch Eintropfenlassen von konzentrierter Schwefelsäure in konzentrierte Salzsäure entwickelter gasförmiger Salzsäure, bis die Lösung anfängt zu rauchen. Nach dem Erkalten des Kolbeninhaltes sättigt man nochmals mit Salzsäuregas, bis alles in Lösung geht: ist dies nicht der Fall, so erhitzt man auf dem Wasserbade unter fortwährendem Schütteln, bis sich der Rückstand vollständig löst.

Enthält das Produkt größere Mengen von Glykokoll, so wird es als salzsaure Ester abgeschieden, der in Alkohol nach der Angabe von Fischer schwer löslich ist. Man engt dann die alkoholische Lösung der salzsauren Ester der Aminosäuren auf etwa $\frac{1}{3}$ des Volumens unter vermindertem Druck und bei einer 40°C nicht übersteigenden Temperatur des Wasserbades und bringt die Lösung durch Einimpfen eines Kristalls von Glykokollesterchlorhydrat und 24stündiges Stehenlassen bei 0°C zur Kristallisation. Das ausgeschiedene Glykokollesterchlorhydrat wird abgenutscht, mit kaltem Alkohol gewaschen und über Kalk und Schwefelsäure im evakuierten Exsikkator getrocknet. Der so erhaltene rohe Ester wird in heißem Alkohol gelöst, die Lösung mit Tierkohle gekocht und filtriert, die Mutterlauge eingengt, wodurch man noch weitere Mengen Ester gewinnen kann. Hierauf vereinigt man die Mutterlauge der letzten Kristallisation mit der Mutterlauge des umkristallisierten Esters, verdampft unter vermindertem Druck bei 40°C zur Trockne und wiederholt die Veresterung unter Anwendung derselben Menge Alkohol noch zweimal.

2. Isolierung der Aminosäureester aus den Esterchlorhydraten.

a) Tritt keine Abscheidung von Glykokoll ein, so wird die ganze Lösung der salzsauren Ester der Aminosäuren unter vermindertem Druck verdampft und die Veresterung noch ein- bis zweimal wiederholt und der Rückstand nach dem Abdampfen des Alkohols und des bei der Veresterung entstandenen Wassers auf die freien Ester verarbeitet. Zu diesem Zweck löst man den Rückstand in wenig Wasser ($\frac{1}{3}$ der Menge Sirup) und verarbeitet nicht zu große Mengen Sirup, nie mehr als 500 g, wobei man einen 2-Literkolben dazu verwendet. Ist der Verdampfungsrückstand größer, so empfiehlt es sich, die wässrige Lösung auf mehrere Kolben zu verteilen. Die im Kochsalzeisgemisch gut abgekühlte wässrige Lösung der Aminosäureesterchlorhydrate überschichtet man mit dem zwei- bis dreifachen Volumen Äther, setzt unter kräftigem Umschütteln abgekühlte 33prozentige Natronlauge in genügender Menge hinzu, schüttelt mehrmals gut durch und gießt den Äther ab, den man in ein mit trockenem Kaliumkarbonat beschicktes Gefäß hineinfltriert. Nach etwa 5 Minuten filtriert man die dunkelgelb bis braun gefärbte Lösung in eine mit geglühtem Natriumsulfat beschickte Flasche und trocknet. Ist die Hauptmenge der Salzsäure mit Natron-

lauge neutralisiert, schüttelt man in der Kältemischung abwechselnd mit kleinen Mengen Kaliumkarbonat und Natronlauge unter Erneuerung des Äthers von Zeit zu Zeit, bis der Kolbeninhalt eine einheitliche bröckelige Masse bildet, wobei keine festen Klumpen entstehen dürfen, und bis der neu zugesetzte Äther farblos bleibt und keinen Rückstand beim Verdunsten hinterläßt. Der Äther wird nun, wie angegeben, mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und bei gewöhnlichem Druck abdestilliert, wobei der abdestillierte Äther stets Glykokoll- und Alaninester enthält, die man in der Weise gewinnt, daß man den Äther mit verdünnter wässriger Salzsäure kräftig durchschüttelt, den Äther abläßt und die wässrig salzsaure Lösung zur Trockne eindampft. Das Drehungsvermögen der wässrigen Lösung dieses Rückstandes zeigt, ob d-Alanin vorhanden ist. Liegt ein Gemisch von salzsaurem Glykokoll und salzsaurem d-Alanin vor, so läßt sich ersteres als das Glykokollesterchlorhydrat abscheiden, während das d-Alanin in der Weise gewonnen wird, daß man die Mutterlauge vom Glykokollester zur Trockne eindampft und den Ester mit Alkali und Kaliumkarbonat in Freiheit setzt, wie oben angegeben ist. Der so erhaltene d-Alaninester wird durch Kochen mit der zehnfachen Menge Wasser verseift und das a-Alanin durch Eindampfen der Lösung erhalten.

b) Den die Esterchlorhydrate der Aminosäuren enthaltenden Sirup löst man in absolutem Alkohol, filtriert und füllt auf ein bestimmtes Volumen auf. Nachdem man in einem aliquoten Teil den Chlorgehalt ermittelt und die berechnete Menge Natrium in so viel Alkohol gelöst hat, daß eine 2½prozentige Lösung entsteht, setzt man nach dem Erkalten die Natriumalkoholatlösung der alkoholischen Esterlösung zu, wobei die Kochsalzausscheidung durch Zusatz von Äther vervollständigt wird, und stellt das Gemisch auf Eis. Die durch Filtrieren oder Zentrifugieren vom Kochsalz befreite alkoholische Esterlösung unterwirft man der fraktionierten Destillation. Die erste Fraktion bis 40° C bei 10 mm Druck wird mit wässriger Salzsäure versetzt, zur Trockne eingedampft und der Rückstand in derselben Weise behandelt wie die aus dem ätherischen Destillat gewonnenen salzsauren Aminosäuren; die weitere Verarbeitung der Aminosäureester geschieht genau nach der Methode a.

3. Fraktionierte Destillation der Monoaminosäureester.

Zur Trennung der Ester genügt folgende Art der Fraktionierung. Die erste Fraktion wird bei 60° C des Wasserbades bei 10—15 mm Druck in mit Kältemischung gekühlter, gewogener Vorlage aufgefangen, die zweite Fraktion bis 100° C des Wasserbades bei 10—12 mm Druck ebenfalls in gewogener Vorlage. Die Destillation wird bis zu einer bestimmten Temperatur so lange fortgesetzt, bis keine Ester mehr übergehen. Sinkt plötzlich der Quecksilberfaden des Thermometers — ein Zeichen, daß bei der momentanen Temperatur des Wasserbades nichts mehr übergeht — so benutzt man diesen Augenblick zur Einschaltung einer neuen Vorlage.

Die zwei folgenden Fraktionen werden unter stark vermindertem Druck destilliert unter Anwendung einer Ölvakuumpumpe oder eines nach Wohl und Losanitsch erzeugten Vakuums. Bei der auf diese Weise erzeugten Druckverminderung auf 0,1—0,5 mm destilliert man aus dem Wasserbade bis 100° C und fängt eine vierte Fraktion unter Verwendung eines Ölbadens von 100 bis 180° C auf.

Die Verseifung der drei ersten Fraktionen geschieht durch 6—8stündiges Kochen am Rückflußkühler mit der sechsfachen Menge Wasser bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion. Man verdampft alle drei Fraktionen unter vermindertem Druck im gewogenen Kolben zur Trockne. Tritt beim Erkalten der verseiften Fraktionen eine kristallinische Ausscheidung ein, so filtriert man diese ab und dampft das Filtrat unter vermindertem Druck zur Trockne ein, kocht den Rückstand mit absolutem Alkohol wiederholt aus, wobei sich die alkoholischen Lösungen beim Erkalten trüben und die mit dem Prolin in Lösung gegangenen, in absolutem Alkohol unlöslichen Aminosäuren abscheiden. Die aus allen drei Fraktionen vereinigten alkoholischen Filtrate werden nun unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol gekocht, vom Unlöslichen abfiltriert und diese Manipulation so oft wiederholt, bis alle alkoholunlöslichen Bestandteile entfernt sind. Das so erhaltene Prolin wird gewogen, durch Kochen mit überschüssigem,

frisch gefülltem Kupferoxyd in das Kupfersalz übergeführt. Die vom Kupferoxyd abfiltrierte Lösung der Prolinsalze wird unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft, der Rückstand zur Trennung des l- vom racemischen Prolinkupfer mit absolutem Alkohol ausgekocht, wobei das l-Prolinkupfer in Lösung geht, aus der man den größten Teil durch Einengen in Kristallform erhalten kann, während ein Teil des Salzes amorph bleibt.

Der unlösliche Teil der drei mit Alkohol ausgekochten Fraktionen wird in Wasser gelöst, durch Kochen mit Tierkohle entfärbt und jede für sich bis zur beginnenden Kristallisation eingeengt und der Prozeß bis zur Verdampfung des gesamten Lösungsmittels wiederholt. Hierauf werden alle Fraktionen getrocknet und gewogen und der Zersetzungspunkt bestimmt; fast alle Aminosäuren haben keinen eigentlichen Schmelzpunkt. Die Zersetzungspunkte sowie der Geschmack können Anhaltspunkte geben; so zersetzt sich das Glykokoll bei 240° C, Alanin und Leuzin gegen 297°, Valin gegen 315°. Glykokoll und d-Alanin haben einen ausgesprochen süßen Geschmack, während d-Valin nur schwach süß schmeckt und einen bitteren Nachgeschmack hat, l-Leuzin hat einen faden und leicht bitteren Geschmack. Die ersten Kristallfraktionen bestehen gewöhnlich fast ganz aus Leuzin, das sich durch Umkristallisieren aus heißem Wasser leicht reinigen läßt, und dessen blaßblaues, fast weißes Kupfersalz sehr charakteristisch und in Wasser schwer löslich ist. Es wird in derselben Weise dargestellt wie das Prolinkupfer, nur muß das ungelöste Kupferoxyd mit Wasser stark ausgekocht werden, sonst ist die Ausbeute schlecht.

Die Trennung von Leuzin und Valin in Mischungen geschieht durch deren fraktionierte Kristallisation und diejenige des Kupfersalzes sowie die Unlöslichkeit des l-Leuzins im Methylalkohol, in dem aber auch Isoleuzin in der Hitze löslich ist und mit dem Valin nach dem Erkalten der Mischung nicht ausfällt, obwohl d-Isoleuzin an und für sich in kaltem Alkohol fast unlöslich ist. Die Trennung dieser drei Körper ist bis jetzt nicht gelungen; das Leuzin und Isoleuzin werden gewöhnlich zusammen bestimmt.

Zum Nachweis und zur Trennung des Glykokolls dient das in absolutem Alkohol schwer lösliche Esterchlorhydrat. Zur Entscheidung der Frage, ob neben Glykokoll noch andere Aminosäuren vorhanden sind, prüft man das optische Verhalten der Lösung. Zur Trennung von seinem gewöhnlichen Begleiter, dem d-Alanin, wird die ganze oder ein Teil der Kristallfraktion mit der fünffachen Menge absoluten Alkohols übergossen, in das Gemisch gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet und, falls keine vollständige Lösung eingetreten ist, auf dem Wasserbade erwärmt. Die auf Eis abgekühlte Lösung wird mit einem Kristall des Glykokollesterchlorhydrats geimpft und auf Eis im gut verschlossenen Gefäß 12 Stunden stehen gelassen. Durch Einengen der Mutterlauge können noch weitere Kristalle erhalten werden. Die Ester aus der Mutterlauge setzt man in oben angegebener Weise in Freiheit, destilliert und verseift sie durch Kochen mit Wasser und gewinnt die Aminosäuren durch Eindampfen der Lösung. Auf diese Weise erhält man sehr oft reines d-Alanin. Zur Trennung von Glykokoll und Alanin bedient man sich des Pikrates, indem man die Kristallfraktion in wenig heißem Wasser löst und die Lösung mit der gleichen Menge Pikrinsäure in alkoholischer Lösung versetzt, wobei beim Erkalten Glykokollpikrat vom Schmelzpunkt 190° C kristallisiert, während Alaninpikrat in Lösung bleibt.

Die vierte Esterfraktion von 100—180° C enthält die Ester des Phenylalanins, der Glutaminsäure, der Asparaginsäure und des Serins. Die Esterfraktion wird zunächst mit dem fünffachen Volumen Wasser versetzt, wobei Trübung infolge der Ausscheidung des Phenylalaninesters in Form von feinen Öltröpfchen eintritt, und mit dem gleichen Volumen Äther im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die klargewordene wässrige Lösung wird abgelassen, die den Phenylalaninester und geringe Mengen anderer Aminosäureester enthaltende Ätherschicht wird zur Entfernung letzterer wiederholt mit Wasser gewaschen, die gesamten wässrigen Lösungen vereinigt und durch Kochen mit Baryt verseift. Zu diesem Zwecke nimmt man die doppelte Menge des Gewichtes der ganzen Esterfraktion an Baryt, löst ihn in heißem Wasser, filtriert in einen großen Rundkolben, gießt nach dem Erkalten von den ausgeschiedenen Barytkristallen ab, bringt die wässrige Lösung der Ester in den Kolben, kocht auf dem Wasserbade zwei Stunden und läßt die Lösung mehrere Tage stehen, wobei sich das racemische asparaginsäure Baryt ausscheidet. Die abfiltrierten Kristalle übergießt man mit 25prozentiger Schwefelsäure

und setzt durch Kochen die Asparaginsäure in Freiheit. Das Filtrat von dem dabei ausgeschiedenen Baryt befreit man vom Überschuß an Schwefelsäure durch Zusatz von Baryt und dampft die abfiltrierte Flüssigkeit zur Trockne ein, wobei reine Asparaginsäure zurückbleibt.

Das Filtrat vom asparaginsäuren Baryt fällt man mit Schwefelsäure, filtriert, dampft unter vermindertem Druck bis zur Trockne ein, wägt, löst den Rückstand in Wasser und sättigt die Lösung mit gasförmiger Salzsäure, wobei Glutaminsäurechlorhydrat meist rein auskristallisiert. Aus der Mutterlauge lassen sich durch Einengen weitere Kristalle isolieren. Das Umkristallisieren geschieht aus konzentrierter Salzsäure.

Die Mutterlauge des Glutaminsäurechlorhydrats, die Asparaginsäure und Serin enthält, wird unter vermindertem Druck eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und zur Entfernung der Salzsäure nochmals eingetrocknet. Die wässrige Lösung des Rückstandes wird so lange mit gelbem Bleioxyd gekocht, bis eine abgekühlte Probe keine Chlorreaktion mehr gibt; sodann befreit man das Filtrat durch Schwefelwasserstoff vom überschüssigen Blei, filtriert vom Bleisulfid ab, engt das Filtrat ein, wobei sich Asparaginsäure ausscheidet, während sich in Lösung das racemische Serin findet. Es ist schwer, das Serin in guter Ausbeute und in reinem Zustande zu isolieren; am besten gelingt seine Isolierung, wenn man die noch sauer reagierende Mutterlauge der Asparaginsäure mit Normalnatronlauge genau neutralisiert und eindampft. Zur Isolierung des Serins benutzt man oft auch die β -Naphthalinsulfomethode.

4. Destillationsrückstand.

Der bei der Destillation der Ester zurückbleibende Rückstand erstarrt beim Erkalten zu einer dunkelbraunroten zähflüssigen oder harten Masse, die sich oft an den Wänden des Destillationskolbens kristallinisch abscheidet. Er enthält Anhydride von Aminosäuren, wie z. B. Leuzinimid, bei Anwendung von Seide Serinanhydrid, ferner wechselnde Mengen von Tyrosinestern und größere Mengen Glutaminsäure.

Man behandelt den Destillationsrückstand mit siedendem Essigäther bis zur Erschöpfung, wobei Anhydride von Aminosäuren in Lösung gehen. Den Rückstand vermischt man mit der doppelten Menge Baryt und Wasser, kocht am Rückflußkühler 16 Stunden, fällt den überschüssigen Baryt quantitativ mit Schwefelsäure aus, dampft das Filtrat vom Bariumsulfat stark ein und scheidet durch Einleiten von gasförmiger Salzsäure die Glutaminsäure als salzsaures Salz aus. Man kann auch Leuzin, Phenylalanin und Asparaginsäure isolieren. Mittels der Estermethode lassen sich auch andere Aminosäuren im Destillationsrückstand nach der Behandlung mit Baryt und dann mit Schwefelsäure isolieren.

Bei der Gewinnung der Aminosäureester mittels Alkali- und Kaliumkarbonat bleibt ein Teil der Ester in Wasser gelöst und ein Teil wird verseift. Bei der Wiederholung der Veresterung läßt sich ein Teil dieser Aminosäureester gewinnen. Zu diesem Zweck wird das bei der Isolierung der Ester aus den Hydrochloraten verbliebene Gemisch in Wasser gelöst, Salzsäure zugesetzt, gasförmige Salzsäure eingeleitet, das Filtrat vom ausgeschiedenen Chlorkalium bis zur Kristallisation eingengt. Dieses Verfahren wird so oft wiederholt, als die abfiltrierten Kristallmassen sich noch frei von organischer Substanz erweisen, sodann dampft man ein, übergießt den Rückstand mit Alkohol und leitet gasförmige Salzsäure ein, wobei die organische Substanz in Lösung geht. Das Filtrat von den ungelösten anorganischen Salzen (KCl) wird unter vermindertem Druck bei 40° C des Wasserbades zur Trockne eingedampft, die Veresterung wiederholt, die Ester wieder in Freiheit gesetzt, fraktioniert, destilliert, verseift und die Aminosäuregemische getrennt.

Folgende Aminosäuren werden nach besonderen Methoden isoliert, da ihre Isolierung direkt mit Hilfe der Estermethode nicht gelingt: l-Oxyprolin, l-Tyrosin, Cystin, l-Tryptophan, d-Glukosamin.

5. Isolierung von Aminosäuren aus Pflanzen.

Nach Schulze und Winterstein.

Zur Isolierung der Aminosäuren verwendet man am besten Pflanzenextrakte, die man durch Extraktion der getrockneten, fein pulverisierten Pflanzen

und Pflanzenteile mit kochendem 90—92proz. Alkohol erhält. Der erhaltene Extrakt wird durch Destillation vom Alkohol befreit, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und mit Bleiessig versetzt, wodurch ein Niederschlag entsteht, der abfiltriert wird, das überschüssige Blei im Filtrat durch Schwefelwasserstoff entfernt und bis zur Sirupkonsistenz eingedampft. Bei Gegenwart größerer Mengen Monoaminosäuren tritt schon beim Eindampfen eine Fällung in Form einer Haut auf, die sich an der Oberfläche der Flüssigkeit ausscheidet. Der nach einigen Tagen auf einer Tonplatte von der dickflüssigen Mutterlange befreite und im Exsikkator getrocknete Niederschlag besteht gewöhnlich aus Tyrosin, Phenylalanin, Leuzin, Isoleuzin, Valin und einigen anderen Aminosäuren, enthält aber auch mitunter Asparagin in geringen Mengen. Das so erhaltene Produkt wird zerrieben, mit Alkohol übergossen, bis nahe zum Sieden erhitzt und mit konzentriertem Ammoniak portionsweise versetzt, wobei die Aminosäuren in Lösung gehen und das in diesem Gemisch am schwersten lösliche Tyrosin und das etwa vorhandene Asparagin zurückbleibt. Die alkoholische Lösung der Aminosäuren wird von dem zurückgebliebenen Tyrosin in ein Becherglas abgegossen und über konzentrierter Schwefelsäure unter einer Glocke verdunsten gelassen, wobei die Aminosäuren farblos kristallisieren und aus ammoniakalischem Alkohol umkristallisiert werden. — Die weitere Behandlung des so erhaltenen Aminosäuregemenges hängt von seiner Zusammensetzung ab. Enthält das Gemenge hauptsächlich Phenylalanin und Valin, so erhitzt man die wässrige Lösung mit Kupferhydroxyd und läßt stehen, wobei in der noch warmen Lösung die Ausscheidung der Kupferverbindung des Phenylalanins beginnt, die in der Kälte vollständig und kristallinisch wird, während in der tiefblauen Lösung Valinkupfer enthalten ist, das man beim starken Eindampfen kristallinisch gewinnt. Zur Reinigung des Phenylalaninkupfers leitet man in seine Lösung Schwefelwasserstoff ein, filtriert vom Schwefelkupfer ab, dampft das Filtrat ein und erhitzt den Rückstand mit Kupferazetat, wobei sich reines Phenylalaninkupfer ausscheidet. In Gegenwart von Leuzin läßt sich das Phenylalanin nicht rein gewinnen, dagegen kann man Valin vom Leuzin mittels der Kupferverbindung durch Methylalkohol trennen, in dem Leuzin unlöslich ist, aber nicht vom Isoleuzin, das sich in Methylalkohol löst.

Steht eine größere Menge des Aminosäuregemisches zur Verfügung, so kann man die Trennung der Aminosäuren durch deren Überführung in die Ester und darauffolgende fraktionierte Destillation im Vakuum bewerkstelligen (s. S. 20).

In Gegenwart von beträchtlichen Mengen Kohlehydrate gelingt es nicht, aus den alkoholischen sirupösen Pflanzenextrakten Aminosäuren durch Kristallisation zu erhalten. In solchen Fällen bedient man sich der Überführung der in den sirupösen Extrakten enthaltenen Aminosäuren in die Ester und der Trennung dieser von den übrigen Extraktbestandteilen durch fraktionierte Destillation.

Identifizierung der einzelnen Monoaminosäuren.

1. Darstellung von β -Naphthalinsulfoderivaten¹⁾.

Man versetzt eine Lösung der Aminosäure in der für ein Molekül berechneten Normalnatronlauge in einer Stöpselflasche mit einer Lösung von 2 Mol.-Gew. ganz reinen β -Naphthalinsulfochlorids in Äther und schüttelt das Gemisch in der Schüttelmaschine bei gewöhnlicher Temperatur, wobei man in Intervallen von ein bis anderthalb Stunden noch dreimal die gleiche Menge Normalnatronlauge hinzufügt. Hierauf gießt man die ätherische Lösung ab, filtriert die wässrige und übersättigt sie mit Salzsäure, wobei die schwer lösliche Naphthalinsulfoverbindung ausfällt, die sich durch ihre Eigenschaften, Schmelzpunkt und Analyse leicht identifizieren läßt. Diese Derivate eignen sich jedoch nicht zur Trennung von Gemischen verschiedenartiger Aminosäuren.

¹⁾ E. Fischer und P. Bergell, Über die β -Naphthalinsulfoderivate der Aminosäuren. Chemische Berichte 35, 3779 (1902).

2. Darstellung der Phenylisozyanatverbindungen und der entsprechenden Hydantoine.

Phenylisozynatverbindung des l-Prolins¹⁾. Es werden 1,8 g l-Prolin in 15 ccm Normalnatronlauge gelöst und die Lösung nach dem Erkalten mit 2 g Phenylisozynat in kleinen Mengen unter kräftigem Schütteln versetzt, die Lösung dann mit Tierkohle durchgeschüttelt, filtriert und angesäuert, wobei die Phenylisozanytverbindung als harzige Masse ausfällt. Da diese Masse nicht kristallisiert, so wird sie in das Hydantoin übergeführt, indem man sie in 4prozentiger Salzsäure löst und auf dem Wasserbade eindampft, wobei sich bald Kristalle ausscheiden. In manchen Fällen läßt sich die Phenylisozynatverbindung kristallinisch erhalten. Es empfiehlt sich nicht, diese Verbindung zur Trennung der Aminosäuren in Gemischen zu verwenden.

3. Darstellung von Benzoylverbindungen.

Benzoylalanin (Fischer)²⁾. Man versetzt eine Lösung mit 3 g Alanin in 30 ccm Wasser mit 22 g gepulvertem Natriumkarbonat, dann mit 14,5 g Benzoylchlorid in kleinen Portionen, schüttelt gut durch, filtriert nach einer Stunde und übersättigt das Filtrat mit Salzsäure, wobei sich ein dicker Kristallbrei ausscheidet. Nach einigem Stehen werden die Kristalle des Benzoylalanins und der Benzoesäure abfiltriert, gewaschen und getrocknet und zur Entfernung der Benzoesäure ausgekocht.

4. Darstellung von Formylverbindungen.

Formylleuzin (Fischer)³⁾. Leuzin wird mit der 1½fachen Menge wasserfreier 98,5prozentiger Ameisensäure in einem mit einem zu einer Kapillare ausgezogenen Steigrohr versehenen Kolben 3 Stunden auf dem Wasserbade erhitzt und unter einem Druck von 20 mm möglichst vollständig eingedampft. Der Rückstand wird nochmals mit der gleichen Menge Ameisensäure 3 Stunden auf 100° erhitzt, abdestilliert und diese Operation mehrmals wiederholt. Der Rückstand erstarrt beim Verdampfen zu einem Kristallbrei, der abfiltriert und mit der 1½fachen Menge eiskalter Normalsalzsäure verrieben, um das unveränderte Leuzin zu lösen, scharf abgesaugt und mit wenig Wasser gewaschen wird, um die Salzsäure zu entfernen. Das Rohprodukt wird in der dreifachen Menge Wasser mit Tierkohle ausgekocht und auskristallisieren gelassen.

Diaminosäuren (Hexonbasen).

1. Isolierung der Hexonbasen aus Eiweißsubstanz⁴⁾.

I. Hydrolyse. 25—50 g der zu untersuchenden Eiweißsubstanz werden mit einer Mischung von dem dreifachen Gewicht konzentrischer Schwefelsäure und dem sechsfachen Gewicht Wasser 14 Stunden am Rückflußkühler gekocht, das Hydrolysat auf 1 Liter aufgefüllt und in 5—10 ccm der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt.

II. Bestimmung des Huminstickstoffs und Ammoniaks. Die schwefelsaure Lösung wird mit einer heißen Barytlösung bis zur schwach sauren Reaktion versetzt, wodurch die ganze Menge Schwefelsäure ausgefüllt wird. Der Niederschlag wird abgesaugt, dreimal mit Wasser ausgekocht, jedesmal

¹⁾ E. Fischer, Über die Hydrolyse des Kaseins durch Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie **33**, 151 (1901).

²⁾ E. Fischer, Über die Spaltung einiger razemischer Aminosäuren in die optischen aktiven Komponenten. Chem. Berichte **32**, 2451 (1899).

³⁾ E. Fischer und O. Warburg, Spaltung des Leuzins in die optisch aktiven Komponenten mittels der Formylverbindung. Chemische Berichte **38**, 3997 (1905).

⁴⁾ Weiß, Untersuchungen über die Bildung des Lachsspermas. Zeitschr. f. physiol. Chem. **52**, 108 (1907).

abgenutscht und mit heißem Wasser gewaschen. Die vereinigten Filtrate und Waschwasser werden eingedampft, zum Liter aufgefüllt und in 10 ccm dieser Lösung der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt, wodurch man die Menge des Huminstickstoffs I erhält. Hierauf werden zweimal je 100 ccm zur Bestimmung des Ammoniaks mit Magnesia destilliert, in $\frac{1}{10}$ Normalsäure aufgefangen und der Überschuß mit $\frac{1}{10}$ Normallauge zurücktitriert. Nachdem der Rest der Flüssigkeit durch Erhitzen auf dem Wasserbade in einer großen Schale mit Magnesia vom Ammoniak befreit worden ist, werden die drei vereinigten Flüssigkeiten mit Barytwasser bis zur stark alkalischen Reaktion versetzt, der Niederschlag abfiltriert, durch dreimaliges Auskochen, Absaugen und Auswaschen mit heißem Wasser gereinigt, das Filtrat vom überschüssigen Baryt durch Zusatz von Schwefelsäure befreit und nach dem Auswaschen des Niederschlages samt dem Waschwasser eingeengt und zum Liter aufgefüllt. Durch Ermittlung des Stickstoffgehalts in 10 ccm dieser Lösung erfährt man durch Umrechnung auf die Gesamtmenge die Menge des im Barytmagnesia-niederschlage zurückgebliebenen Stickstoffs, des sogenannten Huminstickstoffs II.

III. Fällung von Arginin und Histidin als Silberverbindungen. Die unter II erhaltene schwefelsaure Flüssigkeit füllt man in einem 5-Literkolben auf 3 Liter auf, erhitzt auf dem Wasserbade, versetzt die heiße Lösung mit fein gepulvertem Silbersulfat, erhitzt weiter und fügt unter kräftigem Umschwenken so lange Silbersulfat hinzu, bis die Menge ausreicht, d. h. wenn Barytwasser in der silberhaltigen Lösung eine gelbe Fällung erzeugt. Dies wird in der Weise festgestellt, indem man Barytwasser in einem Uhrglase auf schwarzer Unterlage mit einem Tropfen der Flüssigkeit versetzt — entsteht ein rein weißer oder hellgelber Niederschlag, so genügt die Menge des Silbersulfats nicht. Nun läßt man die Flüssigkeit auf 40° C erkalten, sättigt sie mit gepulvertem Baryt, nutsch den entstandenen Niederschlag sofort ab, verreibt ihn mit Barytwasser, saugt ab und wäscht mit barythaltigem Wasser aus. Der Niederschlag wird zur Bestimmung des Histidins und Arginins, die Flüssigkeit zur Bestimmung des Lysins verwendet (Kossel und Kutscher)¹⁾.

2. Isolierung der Hexonbasen aus Pflanzenextrakten.

Der in angegebener Weise (S. 23) gewonnene Pflanzenextrakt wird mit einem geringen Überschuß von Bleiessig versetzt, der entstandene Niederschlag abfiltriert, das Filtrat bei neutraler oder schwach saurer Reaktion auf dem Wasserbade stark eingeengt, mit Schwefelsäure bis auf 5 Proz. angesäuert, filtriert und das Filtrat mit einer konzentrierten Lösung von Phosphorwolframsäure gefällt. Nach längerem Stehen wird der abgenutschte Niederschlag mit 5prozentiger Schwefelsäure ausgewaschen, in Wasser suspendiert und unter Umrühren so viel gepulvertes Bariumhydroxyd hinzugefügt, daß ein Überschuß vorhanden ist, was man an der Fällung beim Einleiten von Kohlensäure erkennen kann. Hierauf wird nun das Ammoniak aus der Flüssigkeit durch längeres, kräftiges Durchsaugen eines Luftstromes oder mittels eines durch eine Turbine getriebenen Rührers vollständig verjagt, was sich daran zu erkennen gibt, daß die Flüssigkeit nicht mehr nach Ammoniak riecht oder feuchtes rotes Lackmuspapier sich nicht mehr bläut und filtriert. Das im Filtrat gelöste Bariumhydroxyd wird durch Einleiten von Kohlensäure entfernt, die abfiltrierte Lösung mit Salpetersäure neutralisiert und auf dem Wasserbade stark eingedampft, wobei man noch Salpetersäure zusetzt, falls die Reaktion wieder alkalisch wird.

Die so erhaltene Basenlösung gibt auf Zusatz von Silbernitrat einen Niederschlag, der Alloxurbasen enthält. Aus dem Filtrat fällt man nach Kossel und Kutscher (s. oben) das Histidin und Arginin.

Bestimmung. Der unter III erhaltene Niederschlag wird mit Sand fein zerrieben, mit schwefelsäurehaltigem Wasser aufgeschwemmt, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, der Überschuß des Schwefelwasserstoffs durch Kochen verjagt, der Niederschlag abgenutscht, wiederholt ausgekocht und bis zum Verschwinden der Phosphorwolframsäurereaktion heiß gewaschen. Das mit dem

¹⁾ A. Kossel und F. Kutscher, Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie 31, 165 (1900—1901).

Waschwasser vereinigte Filtrat wird bis auf 1 Liter eingedampft und in je 20 ccm die Menge des Stickstoffs der durch Silber und Baryt fällbaren Substanzen nach Kjeldahl bestimmt.

Hierauf neutralisiert man die Lösung genau mit Barytwasser, versetzt mit Bariumnitratlösung, solange noch ein Niederschlag entsteht, wäscht den Niederschlag sorgfältig aus, dampft das Filtrat auf 800 ccm ein, säuert es mit Salpetersäure an und versetzt mit Silbernitratlösung, bis eine Tropfenprobe mit Baryt eine Gelbfärbung gibt. Hierauf macht man die silberhaltige Lösung mit Barytwasser nochmals genau neutral, fügt aus einer Burette kleine Mengen Barytwasser hinzu, bis das Histidinsilber vollständig ausfällt. Man prüft die Lösung nach dem Absetzen des Niederschlages, indem man auf einem Uhrglas schwach ammoniakalische Silberlösung zufließen läßt. Entsteht beim Zusammenfließen beider Flüssigkeiten ein im Überschuß des Ammoniaks leicht löslicher Niederschlag, so ist noch Histidin vorhanden und man fügt weiterhin eine kleine Menge Barytwasser hinzu. Sobald die Fällung beendet ist, filtriert man den Niederschlag ab, wäscht ihn mit Wasser sorgfältig aus und bestimmt im Filtrat und Waschwasser des Histidinsilbers das Arginin (s. dort).

Der argininfreie Silberniederschlag wird in schwefelsäurehaltigem Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Schwefelsilber mit kochendem Wasser auf dem Filter ausgewaschen, das Filtrat und Waschwasser auf ein bestimmtes Volumen eingedampft und in einem genau abgemessenen Teil der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt, wodurch man die Menge des im Schwefelsilber zurückgebliebenen Histidin erfährt.

Um das isolierte Histidin zu wägen, wird die Schwefelsäure mit Barytwasser und der überschüssige Baryt mit Kohlensäure entfernt, bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 10—20prozentiger, mit einem Tropfen verdünnter Salpetersäure versetzter Silbernitratlösung gelöst, wobei eine geringe Menge organischer Substanzen zurückbleibt. Nach dem Absaugen wäscht man das Ungelöste mit Wasser aus, fällt aus dem Filtrat das Histidinsilber durch vorsichtigen Zusatz von verdünnter, ammoniakalischer Silbernitratlösung aus, filtriert und zersetzt den Niederschlag mit Salzsäure, dampft bis zur Kristallisation ein und wägt das so auskristallisierte Histidinchlorid nach dem Trocknen im Vakuumexsikkator bei 40° C.

Nach Steudel¹⁾ befreit man den Rest der Flüssigkeit von der Schwefelsäure mittels Barytwasser und den überschüssigen Baryt mittels Kohlensäure, wäscht den Niederschlag mit heißem Wasser nach, dampft das Filtrat und Waschwasser auf etwa 10 ccm ein und bestimmt das Histidin in Form des gut kristallisierenden und schwer löslichen Pikrolonats. Aus der nach Kjeldahl erhaltenen Menge Stickstoff läßt sich die zur Ausfällung erforderliche Pikrolonsäuremenge berechnen. Man versetzt die Lösung mit einer heißen alkoholischen Pikrolonlösung, läßt 3 Tage stehen, filtriert, wäscht den Niederschlag mit wenig Wasser aus, trocknet bei 100° C und wägt. Die Histidinmenge wird nach der Formel $C_{10}H_8N_4O_5 \cdot C_6H_5N_3O_2$ berechnet. C 45,8 Proz., H 4,09 Proz., N 23,44 Proz.

Über die Darstellung des Histidins aus Pflanzensamen siehe bei Arginin.

Das Histidin kann man auch in der Weise gewinnen, daß man den Phosphorwolframsäureniederschlag mit Bariumhydroxyd zerlegt, die Lösung vom Baryt durch Kohlensäure befreit, sie mit einer wässrigen Mercurichloridlösung versetzt, den dabei entstandenen Niederschlag abfiltriert und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom ausgeschiedenen Schwefelquecksilber liefert beim Eindampfen Histidinchlorid, durch Überführung in das Silbersalz und Bestimmung des Silbergehaltes läßt sich das Histidin identifizieren.

3. Isolierung der Purinbasen aus Organen und Geweben.

Man kocht die zerkleinerten Organe oder Gewebe 3—4 Stunden lang mit 5promilliger Schwefelsäure, filtriert, fällt das Filtrat mit Bleiessig, filtriert das Eiweiß ab, entfernt den Bleiüberschuß mittels Schwefelwasserstoff, dampft das Filtrat ein und fällt nach Zusatz von überschüssigem Ammoniak mit ammoniakalischer Silberlösung. Hierauf löst man die ausgeschiedenen Silberverbindungen in siedender Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,1, wobei man etwas Harnstoff zusetzt, um Nitrierung zu verhindern, und filtriert siedend

¹⁾ H. Steudel, Das Verhalten der Hexonbasen zur Pikrolonsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 219. Ebenda 44, 157.

heiß. Beim Erkalten bleibt das Xanthinsilbernitrat in Lösung, während die Doppelverbindungen von Guanin, Hypoxanthin und Adenin auskristallisieren. Man filtriert und versetzt das Filtrat mit Ammoniak, wodurch das Xanthinsilber ausfällt, das man mit Schwefelwasserstoff frei macht. Die oben genannten Silberverbindungen werden nun in Wasser suspendiert und in der Hitze mit Schwefelammonium behandelt, das dabei ausgefallene Schwefelsilber abfiltriert, das Filtrat eingeengt, mit Ammoniak übersättigt und auf dem Wasserbade digeriert, wobei Hypoxanthin und Adenin in Lösung gehen, während Guanin ungelöst zurückbleibt. Um den Teil des Guanins, der vom Schwefelsilber zurückgehalten wird, zu gewinnen, kocht man mit verdünnter Salzsäure und übersättigt das Filtrat mit Ammoniak. Das adenin- und hypoxanthinhaltige Filtrat wird durch weiteres Verdunsten vom Ammoniak befreit und erkalten gelassen, wobei sich Adenin ausscheidet, während Hypoxanthin in Lösung bleibt.

4. Bestimmung der Gesamtmenge der Purinbasen in tierischen Organen.

Der Organbrei wird zunächst mit einer größeren Menge (1000 ccm pro 100 g Brei) stark verdünnter Schwefelsäure (0,5—1 Volumprozent) 12 Stunden am Rückflußkühler gekocht, filtriert, Filter nebst Rückstand ausgekocht und das Waschwasser mit dem ersten Filtrat vereinigt; diese Prozedur wiederholt man noch zweimal. Nun übersättigt man die Flüssigkeit mit feingepulvertem Ätzbaryt unter gutem Umrühren, filtriert den ausgeschiedenen Niederschlag ab, wäscht mit Wasser von 60° C aus und leitet in das mit dem Waschwasser vereinigte Filtrat einen Kohlensäurestrom bis zur neutralen oder schwach sauren Reaktion ein, um den Baryt zu entfernen. Das Filtrat vom Bariumkarbonatniederschlag wird mit Essigsäure stark angesäuert, bis auf 100 ccm für 100 g Brei, dann mit einem Gemisch gleicher Volumina 33prozentiger Natronlauge und halbgesättigter Sodalösung vom neuerlichen Bariumkarbonatniederschlag abfiltriert, mit Wasser von 60° C nachgewaschen, das Filtrat mit wenig starker Salzsäure angesäuert und mit Ammoniak übersättigt. Das Volumen darf nicht mehr als etwa 200 ccm für 100 g Organbrei betragen. Das ammoniakalische Filtrat fällt man je nach der zu erwartenden Menge von Purinstoffen mit 30—50 ccm der Ludwigschen ammoniakalischen Silberchloridlösung, läßt mehrere Stunden stehen, filtriert und wäscht einmal mit sehr verdünntem Ammoniak und dann unter Aufwirbeln des Niederschlages mit heißem Wasser nach. In dem so ausgewaschenen Niederschlag bestimmt man den Niederschlag nach Kjeldahl, wobei man nach dem Vorschlage von Arnstein den Niederschlag im Kjeldahlkolben mit wenig Wasser und Magnesiaoxyd kocht, um die Ammoniakreste zu entfernen.

5. Quantitative Bestimmung der verschiedenen Purinbasen in tierischen Organen.

Die Bestimmung geschieht in den Hauptzügen nach dem oben angegebenen Verfahren. Das Xanthin wird als Xanthinsilber gewogen. Die drei Silbernitratverbindungen bringt man in stark ammoniakhaltiges Wasser und digeriert einige Zeit in der Wärme, wobei die Silbernitratverbindungen in die entsprechenden Silberverbindungen übergehen, saugt diese ab und wäscht so lange mit ammoniakhaltigem Wasser, bis sie salpetersäurefrei sind und digeriert sie in Wasser mit Schwefelammonium in der Wärme. Das Guanin bleibt zurück und wird als solches gewogen. Das ammoniakalische Filtrat des Adenins und Hypoxanthins wird nun neutralisiert, mit einer kalten, konzentrierten Lösung von Natriumpikrat bis zur deutlich gelben Farbe versetzt, das gefällte Adeninpikrat sofort abfiltriert, mit Wasser gewaschen, bei 100° C getrocknet und gewogen. Das Hypoxanthinfiltrat wird siedend heiß mit Silbernitrat versetzt und nach dem Erkalten mit Silbernitrat geprüft. Das Hypoxanthinsilbernitrat wird ausgewaschen, bei 100° C getrocknet und gewogen. Die Trennung des Adenins und Hypoxanthins ist nur bei Abwesenheit von Salzsäure anwendbar. Wegen der beträchtlichen Löslichkeit des Guanins in warmem Ammoniak führt die Trennungsmethode mit Ammoniak zu ungenauen Resultaten. Nach Kossel und Wulff¹⁾ fällt man das Guanin aus stark verdünnter Lösung

¹⁾ C. Wulff, Beiträge zur Kenntnis der Nukleinbasen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 17, 468 (1893).

mit überschüssiger Metaphosphorsäure, wäscht den Niederschlag aus und bestimmt den Stickstoff nach Kjeldahl. Aus dem Filtrat fällt man das Adenin und Hypoxanthin durch Zusatz eines Überschusses von Ammoniak und Silberlösung aus, die Silberverbindungen zersetzt man mit sehr verdünnter Salzsäure und trennt das Adenin vom Hypoxanthin.

6. Isolierung der Purinbasen aus Pflanzen.

Das Ausgangsmaterial wird mit heißem Wasser oder stark verdünntem Alkohol unter Zusatz von etwas Mineralsäure extrahiert, die Extrakte mit Bleiessig bis zur vollständigen Fällung versetzt, wobei man einen Überschuß möglichst vermeidet. Das Filtrat wird mit Merkurinitrat gefällt, der weiße Niederschlag auf dem Filter mit kaltem Wasser gewaschen, in Wasser suspendiert und Schwefelwasserstoff eingeleitet. Das Filtrat dampft man nun ein, entfernt den Schwefelwasserstoff und fällt mit ammoniakalischer Silbernitratlösung.

Die Fällung der Purinbasen mit Phosphorwolframsäure geschieht in der Weise, daß man die Pflanzenextrakte mit Bleiessig reinigt, das Blei mit Schwefelsäure ausfällt und das Filtrat vom Bleisulfat mit konzentrierter Phosphorwolframsäure versetzt, bis keine Fällung mehr entsteht, und läßt 24 Stunden stehen. Hierauf wäscht man den entstandenen Niederschlag auf der Nutsche mit 5prozentiger Schwefelsäure aus, verreibt mit einem Überschuß von Baryt, saugt ab und leitet in das Filtrat Kohlensäure ein, um den überschüssigen Baryt zu entfernen. Das vom kohlensauen Barium befreite Filtrat wird mit Salpetersäure fast neutralisiert, auf dem Wasserbade eingedampft und mit Silbernitrat gefällt.

Krüger¹⁾ entfernt zuerst aus der verdünnten Teelauge die Huminsubstanzen durch Zusatz von Schwefelsäure, neutralisiert das Filtrat mit Natronlauge, erhitzt zum Sieden und fällt die Basen mit Kupfersulfat und Natriumbisulfat. Die ausgeschiedenen braunen Flocken werden in heißem Wasser suspendiert, mit einem geringen Überschuß von farblosem Natriumsulfid zersetzt und das Filtrat nochmals mit Kupfersulfat und Natriumbisulfat gefällt. Dieser Niederschlag enthält außer Koffein und Theobromin die Alloxurbasen.

Koffeindarstellung. Aus Kaffee erhält man die Base in der Weise, daß man die gemahlene Bohnen dreimal mit Wasser auskocht, die vereinigten Auszüge mit Bleiessig (kein Überschuß) ausfällt, den Überschuß von Blei mittels Schwefelwasserstoff entfernt, das Filtrat unter Zusatz von reiner Magnesia und Sand zur Trockne eindampft und den Rückstand mit Chloroform extrahiert. Nach dem Verdunsten des Chloroforms erhält man das Koffein in fast reinem Zustande, und es wird durch Umkristallisieren aus Chloroform, Wasser oder Alkohol gereinigt.

Quantitativ bestimmt man nach Katz-Beitter²⁾ das Koffein, indem man 10 g Pulver mit 200 g Chloroform und 5 g Ammoniak 30 Minuten lang schüttelt, 150 g des Filtrats eindampft, den Rückstand in 5 ccm Äther löst, 20 ccm einer 0,5prozentigen Salzsäure hinzufügt und den Äther auf dem Wasserbade verdunstet. Die Lösung wird nach dem Erkalten filtriert, das Filter mit 0,5prozentiger Salzsäure ausgewaschen, das Filtrat mit Chloroform 2 Stunden im Extraktionsapparat ausgezogen, das Chloroform verdunstet und der Rückstand gewogen.

Theobromin. Zur Darstellung des Theobromins wendet man am besten entfettete Kakaobohnen an und verfährt in derselben Weise wie beim Koffein.

Dekker³⁾ kocht Kakaopulver mit der halben Menge Magnesia und der 30fachen Menge Wasser eine Stunde lang am Rückflußkühler, filtriert, dunstet zur Trockne ein und kocht den Rückstand mit Chloroform aus. Das in Lösung gegangene Koffein wird mit Benzol entfernt.

Theophyllin. Man verdünnt den Teextrakt mit Wasser, versetzt mit

¹⁾ M. Krüger, Die Gewinnung des Adenins aus Teextrakt. Zeitschr. f. physiol. Chemie **21**, 278 (1890).

²⁾ Katz, Berichte d. pharm. Gesellsch. **12**, 250 (1902). — A. Beitter, Ibidem **12**, 239.

³⁾ Dekker, Untersuchungen über einige Bestandteile des Kakaos und Kolas. Rec. de travaux chim. d. Pays-Bas **22**, 142 (1903).

Schwefelsäure, wobei sich eine harzartige Substanz ausscheidet, die man abfiltriert; das Filtrat wird mit Ammoniak stark alkalisch gemacht und mit ammoniakalischem Silbernitrat gefällt. Man läßt 24 Stunden stehen, filtriert den Niederschlag ab, digeriert ihn mit warmer Salpetersäure und läßt erkalten, wobei sich Silberdoppelverbindungen des Adenins und Hypoxanthins ausscheiden. Das Filtrat von diesen Verbindungen wird mit Ammoniak übersättigt, wodurch ein Niederschlag aus Xanthin- und Theophyllinsilber ausfällt, der nach einigem Stehen abfiltriert, ausgewaschen und, nach dem Ansäuern mit Salpetersäure, mit Schwefelwasserstoff zersetzt wird. Beim Eindunsten fallen zunächst geringe Mengen von Xanthin aus, und bei stärkerer Konzentration scheidet sich das Theophyllin in Nadeln oder rhombischen Kristallen ab.

7. Trennung der Alloxurbasen.

Die von Krüger und Salomon angegebene Methode zur Trennung der Basen des Harns eignet sich auch für die Pflanzenbasen.

Allantoin. Die Pflanzenextrakte werden zum Zwecke der Reinigung mit Bleiessig versetzt, das Filtrat vom Bleiniederschlag mit Merkurinitrat gefällt, der Niederschlag ausgewaschen und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die vom Schwefelquecksilber abfiltrierte Flüssigkeit wird mit Ammoniak neutralisiert, bei gelinder Wärme eingedunstet und zwecks Trennung des Allantoins vom Asparagin mit Kupferhydroxyd in der Hitze gesättigt, wobei sich beim Erkalten das Kupfersalz des Asparagins ausscheidet. Wird nun das Filtrat vom Kupfer durch Schwefelwasserstoff befreit und eingedunstet, so scheidet sich Allantoin kristallinisch aus. Kristallisieren Allantoin und Asparagin zusammen, so trennt man beide durch Unkristallisieren, da Asparagin leichter löslich ist als Allantoin.

Vernin. Zur Darstellung des Vernins verfährt man nach Schulze und Boshard in folgender Weise. Die wässerigen Pflanzenextrakte werden mit Bleiessig versetzt, das Filtrat vom Bleiniederschlag mit Merkurinitrat gefällt, der Niederschlag ausgewaschen und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber wird nach der Neutralisation mit Ammoniak vorsichtig eingeeengt, erkalten gelassen, wobei sich eine Gallerte bildet, die geringe Mengen von Asparaginkristallen einschließt. Die Fällung wird auf dem Filter mit kaltem Wasser oder verdünntem Alkohol ausgewaschen und aus Wasser umkristallisiert, wobei die Asparaginkristalle in Lösung bleiben, während das Vernin sich sofort ausscheidet.

Die Verteilung des Stickstoffs im Eiweißmolekül.

Wie aus den Spaltungen nach Hausmann ¹⁾ hervorgeht, enthalten die Eiweißkörper den Stickstoff 1. in einer Form, die bei Einwirkung von Säuren und Alkalien leicht zur Bildung von Ammoniak-salz führt, Amidstickstoff (Ammoniakstickstoff, locker gebundener Stickstoff), 2. in einer Form, in der er durch Säuren gar nicht, durch Alkali nur unvollkommen abgespalten wird — der Stickstoff der Amino- und Diaminosäuren, dieser läßt sich trennen in solchen, der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Verbindungen angehört, also der Diaminokapronsäure (Lysin), Guanidinaminovaleriansäure (Arginin) und dem Histidin — den Diaminostickstoff, und in solchen, der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Verbindungen angehört, d. h. den die große Masse der Eiweißkörper darstellenden Monoaminosäuren, dem Leuzin, Tyrosin, der Asparaginsäure, Glutaminsäure u. a. — Monoaminostickstoff.

¹⁾ W. Hausmann, Über die Verteilung des Stickstoffs im Eiweißmolekül. Zeitschr. f. physiol. Chemie 27, 95 (1899); 29, 136 (1900).

Man kocht 1 g der trockenen Proteinsubstanz in einem Kolben mit Steigrohr mit 20 ccm konzentrierter Salzsäure 5 Stunden lang. Zur Bestimmung des Ammoniaks wird Magnesia benutzt, die vorher in kleinen Portionen geglüht, dann in einen Destillationskolben mit Wasser gebracht und 1 Stunde im Sieden erhalten wird, um jede Spur von etwa vorhandenem Ammoniak zu verjagen. Die auf ein geringes Volumen abdestillierte Flüssigkeit läßt man erkalten, fügt die vorher in einem Becherglas mit Magnesia unter Kühlung neutralisierte Zersetzungsfüssigkeit hinzu, destilliert und fängt das entweichende Ammoniak in $\frac{1}{10}$ Normalschwefelsäure. Der Überschuß der Schwefelsäure wird mit $\frac{1}{10}$ Normallauge zurücktitriert und man erhält den Amidstickstoff.

Der Rückstand im Kolben wird in Salzsäure gelöst, die Lösung auf ein kleines Volumen gebracht, in ein Becherglas übergeführt, mit Phosphorwolframsäurelösung ausgefällt und der Niederschlag 24 Stunden sich selbst überlassen. Hierauf wird er aufs Filter gebracht und mit verdünnter, salzsäurehaltiger Phosphorwolframsäurelösung gewaschen, bis die Flüssigkeit nicht mehr gelb gefärbt abläuft. Filter samt Niederschlag bringt man in einen Meßzylinder, löst den Niederschlag in der erforderlichen Menge Kalilauge, füllt Flüssigkeit auf ein bestimmtes Volumen auf und filtriert. In einem genau gemessenen aliquoten Teil des Filtrates bestimmt man den Stickstoffgehalt nach Kjeldahl und erhält so die Menge des Diaminostickstoffs.

Das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag samt den Waschwässern wird auf ein kleines Volumen eingedampft und in einem genau gemessenen aliquoten Teil der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt; man erfährt so die Menge des Monoaminostickstoffs.

Die Menge der bei der Hydrolyse des Eiweißes entstehende Huminsubstanz fällt so wenig ins Gewicht, daß man sie nach Hausmann, ohne die Resultate besonders zu beeinträchtigen, unberücksichtigt lassen kann.

III. Stickstoffhaltige Substanzen nichteiweißhaltiger Natur.

Den Gehalt an stickstoffhaltigen Substanzen nichteiweißartiger Natur pflegt man gewöhnlich aus der Differenz zwischen dem Gesamtstickstoffgehalt und dem in Form von reinem Protein ermittelten Stickstoff zu berechnen. Um einen Einblick in die Verteilung dieses Stickstoffs zu erhalten, bestimmt man nach Sachsse das Ammoniak, den Amid- und Säureamidstickstoff.

Darstellung des Extraktes. Man übergießt die zu untersuchenden frischen oder getrockneten Pflanzen oder Pflanzenteile mit Wasser und läßt bei 50° C unter öfterem Umrühren stehen oder steigert bei stärkemehlfreien oder stärkemehlarmen Substanzen die Temperatur höher und sogar bis zum Sieden, wobei ein längeres Kochen bei leicht zersetzlichen Pflanzenbestandteilen zu vermeiden

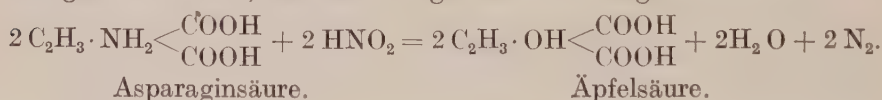
ist. Wenn manche Pflanzenbestandteile in reinem Zustande in Wasser schwer löslich sind, so wird ihre Löslichkeit bei 50° C durch die Gegenwart anderer leicht löslicher Substanzen sehr befördert. Auch bei der Extraktion mit Alkohol gilt das gleiche Verhalten; die sonst schwer löslichen Bestandteile lösen sich mit Leichtigkeit, wenn die zerkleinerten Pflanzen mit kochendem 90—92prozentigem Alkohol behandelt werden.

Bei der Extraktion mit Wasser empfiehlt es sich, die Substanz zuerst zweimal je 1 Stunde mit der zehnfachen Menge kalten Wassers zu digerieren, mittels der Saugpumpe zu filtrieren und dann mit der gleichen Menge Wasser einmal auszukochen. Die vereinigten Filtrate werden durch Kochen vom Eiweiß befreit, das Filtrat auf ein geringes Volumen eingedampft, mit Schwefelsäure angesäuert, mit Phosphorwolframsäure gefällt, vom Niederschlag abfiltriert und das Filtrat auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt.

Statt mit Wasser kocht man nach dem Vorschlage von Kellner die Pflanzenstoffe (10 g) in einem Kolben mit Steigrohr mit 300 cem 30—40prozentigem Alkohol unter Zusatz von einigen Tropfen Essigsäure etwa 1½ Stunden, filtriert, dampft das Filtrat auf dem Wasserbade ein, nimmt den Rückstand mit Wasser auf und verfährt weiter wie oben angegeben ist.

Die Bestimmung des Aminosäure- und Säureamidstickstoffs.

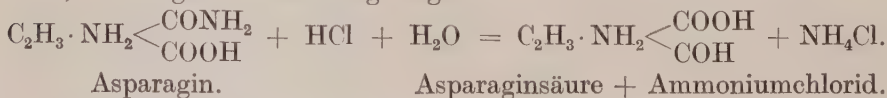
Das Prinzip dieses Verfahrens beruht darauf, daß die Aminosäuren, bei denen der Wasserstoff im Radikal durch Aminogruppen (NH₂) ersetzt ist, mit salpetriger Säure wie Ammoniak freies Stickstoffgas entwickeln, im Sinne folgender Gleichung:



Ähnlich verhält sich Leuzin, das in Leuzinsäure und freien Stickstoff zerfällt, und Tyrosin, und es entsprechen

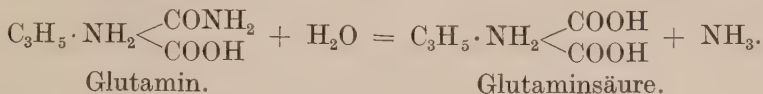
$$28 \text{ Teile Stickstoff} = 173 \text{ Teilen Asparaginsäure} = 131 \text{ Teilen Leuzin} \\ = 181 \text{ Teilen Tyrosin.}$$

Die Aminosäureamide, bei denen das Hydroxyl, die Karboxylgruppe, durch eine zweite Aminogruppe ersetzt ist, geben bei der Behandlung mit salpetriger Säure nur die eine Hälfte des Stickstoffs als Gas ab, während die an das Karboxyl gebundene Aminogruppe durch Kochen mit anderen verdünnten Säuren in Ammoniak umgewandelt wird, wie folgende Gleichung zeigt:



Wird nun die Asparaginsäure nach dem Verjagen des Ammoniaks durch Alkalien oder alkalische Erden mit salpetriger Säure behandelt,

so entsteht ebenfalls Äpfelsäure und freier Stickstoff. Man kann auch die Menge des in Form von Ammoniak abgespaltenen Stickstoffs ermitteln und daraus den Asparagingehalt berechnen, wobei 132 Teile wasserfreies Asparagin 17 Teile Ammoniak liefern. Das Glutamin zerfällt bei gleicher Behandlung in Glutaminsäure und Ammoniak nach der Gleichung:



wobei 146 Teile Glutamin 17 Teile Ammoniak abgeben.

Zur Bestimmung der Amidverbindungen füllt man den in oben angegebener Weise dargestellten Extrakt auf ein bestimmtes Volumen und teilt die Flüssigkeit in drei Teile.

1. Einen Teil der Lösung verwendet man zur Bestimmung des fertig gebildeten Ammoniakstickstoffs.

2. Den zweiten Teil benutzt man zur Bestimmung des fertig gebildeten Ammoniakstickstoffs und des aus dem Säureamidstickstoff entstehenden Ammoniakstickstoffs.

3. Der dritte Teil dient zur Bestimmung des Aminosäurestickstoffs.

1. Ammoniakstickstoff.

Nachweis des Ammoniaks.

Die Gegenwart des Ammoniaks läßt sich beim Erhitzen der Substanz mit Alkalilauge am charakteristischen Geruch, sowie an der Bläuung von befeuchtetem rotem Lackmuspapier nachweisen.

Spuren von Ammoniak weist man mit Nessler's Reagens (alkalische Kaliumquecksilberjodidlösung) nach, die man in folgender Weise bereitet: Eine heiße Lösung von 50 g Kaliumjodid in 50 ccm Wasser versetzt man mit einer konzentrierten Sublimatlösung, bis der entstandene rote Niederschlag sich nicht mehr löst. Das Filtrat versetzt man mit einer Lösung von 150 g Kaliumhydroxyd in 300 ccm Wasser, verdünnt zum Liter, fügt etwa 5 ccm der Sublimatlösung hinzu, läßt den entstandenen Niederschlag absetzen und dekantiert. Die Lösung wird in gut verschlossenen Flaschen aufbewahrt. Die Wirkung dieses Reagens besteht in einer Bildung eines rötlich braunen Niederschlages oder, in sehr verdünnten Lösungen, einer gelben Lösung von Dimerkuriammoniumjodid $\text{Hg}_2\text{NJ} \cdot \text{H}_2\text{O}$. Natürlich darf die zu untersuchende Substanz keine ähnliche Verbindungen enthalten, die durch dieses Reagens gefällt werden, wie z. B. Amine. In solchen Fällen saugt man durch drei miteinander verbundene Flaschen, von denen die erste mit konzentrierter Schwefelsäure, die zweite mit der zu prüfenden Flüssigkeit und die dritte mit dem Nesslerreagens gefüllt ist, einen Luftstrom durch, wobei in der letzten Flasche ein rötlichbrauner Niederschlag oder eine gelbe Färbung entsteht.

Enthält die zu untersuchende Flüssigkeit alkalische Erden, so müssen diese durch Natriumkarbonat entfernt werden, oder man versetzt die Lösung mit 2—3 ccm gesättigter Seignettesalzlösung pro 100 ccm (Winkler).

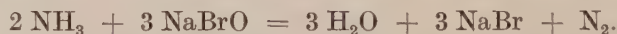
Quantitative Bestimmung.

Destillation mit starken Basen. Man destilliert die Lösungen nach Zusatz von Natronlauge, Kalkmilch oder Magnesia, fängt das freigewordene Ammoniak in titrierter Schwefelsäure oder Salzsäure auf. Man bringt in einen 400—500 ccm fassenden Erlen-

meyerkolben etwa 1 g der zu untersuchenden Substanz in 200 ccm Wasser gelöst oder 100—200 ccm der Flüssigkeit, fügt einen Tropfen Lackmustinktur hinzu und läßt, falls die Lösung sauer reagiert, von der vorher ausgekochten 10 prozentigen Natronlauge oder Kalkwasser unter Umschwenken bis zur Blaufärbung der Lösung und dann noch weitere 10 ccm zufließen, erhitzt die Flüssigkeit zum Sieden und destilliert 100 ccm in die mit $\frac{1}{10}$ Normalsalzsäure oder Schwefelsäure beschickte Vorlage über, die mit einer mit 20 ccm titrierten Säure und etwas destilliertem Wasser beschickten Péligot-röhre verbunden ist. Der Überschuß der Säure in der Vorlage wird mit Natronlauge zurücktitriert und der Ammoniakstickstoff berechnet. 1 ccm $\frac{1}{10}$ Normalsäure neutralisiert 0,001404 g Ammoniakstickstoff = 0,001706 g Ammoniak.

Destillation unter vermindertem Druck. Sellier empfiehlt, die zu untersuchende Flüssigkeit, falls sie sauer ist, mit Natriumkarbonat zu neutralisieren, mit Wasser zu verdünnen, etwas Vaseline zur Vermeidung des Schäumens hinzuzufügen, mit einem Überschuß von Magnesia zu versetzen und etwa 1 Stunde bei 50° C zu destillieren.

Bestimmung mit Natriumhypobromit. Die von Knopp und dann von Wagner modifizierte Methode beruht darauf, daß Ammoniak durch Natriumhypobromit unter Abgabe von Stickstoff oxydiert und im Azotometer aufgefangen und gemessen wird:



Die dazu nötige Bromlauge bereitet man, indem man 100 g Natriumhydroxyd in Wasser löst, auf 1250 ccm verdünnt, in Wasser erkalten läßt, mit 25 ccm Brom versetzt, gut durchschüttelt und erkalten läßt. Diese Lösung muß in gut verschlossener Flasche im Dunkeln aufbewahrt werden.

Man säuert die zu untersuchende Flüssigkeit mit Salzsäure an, dampft fast bis zur Trockne ein, läßt aus einer mit destilliertem Wasser gefüllten 10-ccm-Pipette einige Tropfen zufließen, bringt diese Lösung mittels einer Trichterröhre in die eine Abteilung des Entwicklungsgefäßes *A* (Fig. 2) und spült mit dem in der Pipette zurückgebliebenen Wasser Porzellanschale und Trichterrohr. In die andere Abteilung des Entwicklungsgefäßes läßt man 50 ccm der Bromlauge zufließen, verschließt dieses und senkt es in das Kühlgefäß *B*, so daß es gerade noch vom Wasser bedeckt ist. Das Entwicklungsgefäß steht mit dem Glasrohr im Zylinder in Verbindung. Durch Lockern oder Herausziehen des Hahnes werden die kommunizierenden Röhren *c* mit Wasser gefüllt, durch Ablassen des Wassers aus dem unteren äußeren Hahn *h* stellt man den unteren Meniskus des Wasserspiegels genau auf den Nullpunkt der graduierten Röhre ein. Nach 5 Minuten wird der Glasahn des Gefäßes *A* wieder geschlossen und so gestellt, daß dieses mit dem graduierten Rohr *c* in Verbindung steht, und beobachtet, ob nach 5 Minuten der Wasserspiegel im graduierten Rohr infolge der durch die Abkühlung bewirkten Kontraktion der Luft noch ge-

stiegen ist. Ist dies der Fall, so öffnet man den Glashahn *a* nochmals, drückt ihn wieder fest ein und beobachtet wieder nach 5 Minuten und wiederholt diese Manipulation, bis das Wasserniveau auf dem Nullpunkt gleichbleibend einsteht. Dann nimmt man das Entwicklungsgefäß heraus, läßt durch den Hahn *h* 20—30 cm Wasser abfließen, neigt unter Schwenken das Gefäß so, daß die Bromlauge zu der Flüssigkeit hinzufließt und die Entwicklung des Stickstoffs stattfindet. Nun schließt man den Glashahn *a*, schüttelt das Entwicklungsgefäß gut durch, treibt den entstandenen Stickstoff durch Öffnen des Hahnes in das graduierte Rohr *c* über und wiederholt diese Behandlung dreimal. Das Entwicklungsgefäß bringt man in das Kühlgefäß und setzt es wieder mit der graduierten Röhre in Verbindung. Nach 15 Minuten nimmt das Gefäß die frühere Temperatur wieder an, man läßt durch den Hahn *h* so viel Wasser ab- oder zufließen, bis das Niveau in beiden kommunizierenden Röhren gleich hoch steht und liest dann die Anzahl Kubikzentimeter des entwickelten Stickstoffs, die Temperatur des im Zylinder befindlichen Thermometers sowie den Barometerstand.

Die in der Flüssigkeit des Entwicklungsgefäßes absorbierte Menge Stickstoff muß bei der Berechnung berücksichtigt werden und wird mittels der Dietrichschen Tabelle¹⁾ ermittelt, wobei man die oben angegebenen Mengenverhältnisse zwischen Untersuchungsflüssigkeit und Bromlauge streng einhalten muß, da mit der Konzentration sich die Menge des absorbierten Gases ebenfalls ändert.

Über andere Methoden zur Bestimmung des Ammoniaks siehe beim Harn.

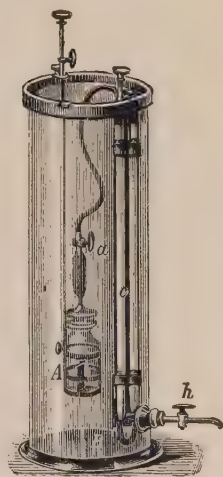


Fig. 2.
Azotometer nach
Knopp-Wagner.

2. Salpetersäure.

Nachweis. a) Bruzinreaktion. Fügt man zu 1 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit in einer Porzellanschale einige Körnchen Bruzin und 1 ccm reine konzentrierte Schwefelsäure hinzu, so entsteht eine Rotfärbung.

b) Diphenylaminreaktion. Fügt man zu 1 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit in einer Porzellanschale einige Körnchen Diphenylamin und 1 ccm reine konzentrierte Schwefelsäure hinzu und rührt um, so entsteht Blaufärbung.

c) Äußerst empfindlich ist die Modifikation von Cimmino²⁾, nach der man in einem Reagenzglas zu 1 ccm der Flüssigkeit 3—4 Tropfen einer Lösung von Diphenylaminschwefelsäure in 5—10prozentiger Salzsäure und 2 ccm konzentrierter Schwefelsäure zusetzt und umschüttelt, wodurch Blaufärbung, auch bei einer Verdünnung von 1 : 1000000, eintritt.

Quantitative Bestimmung. Zur quantitativen Bestimmung der Salpetersäure ist eine Reihe von Methoden angegeben, von denen

¹⁾ König, Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel. B. 3, 630—1.

²⁾ Zeitschr. f. anal. Chem. 38, 429.

sich für alle Fälle und besonders für wasserlösliche organische Stickstoffsubstanzen, wie Fleisch-, Pflanzenauszüge usw., das volumetrische Verfahren von Schlösing und Grandeau in der Ausführung von Tiemann und Schulze eignet (siehe auch bei Harn). •

a) Bestimmung der Salpetersäure als Stickoxyd nach Schlösing¹⁾ und Grandeau²⁾.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß beim Erhitzen eines Nitrats mit Eisenchlorür und Salzsäure die Salpetersäure zu Stickoxyd reduziert wird im Sinne folgender Gleichung



Das freiwerdende Stickoxyd wird aufgefangen, gemessen und aus dem Volumen das Gewicht berechnet.

1. Die zur Ausführung der Bestimmung erforderliche Eisenchlorürlösung stellt man dar, indem man dünne Drahtstifte mit konzentrierter Salzsäure beizt und dann mit 25prozentiger Salzsäure in einem Kolben übergießt und bei mäßiger Temperatur digeriert. Den Kolben verschließt man durch einen Stopfen mit fein ausgezogener, offener Glasröhre. Die gesättigte grüne Lösung läßt man über dem Eisen stehen und filtriert nur soviel ab, als man für jeden Versuch braucht.

2. Eine Nitratlösung erhält man durch Auflösen von 2,0232 g reinem, umkristallisiertem und bei 160° getrocknetem Salpeter zum Liter, wovon 50 ccm bei 0° und 760 mm 22,41 ccm NO abgeben.

Man kocht aus dem Kolben (Fig. 3) die Luft aus, gießt 30 ccm der Eisenchlorürlösung in ein Becherglas, markiert den Stand, gießt weitere 20 ccm Eisenchlorürlösung ein und markiert wieder den Stand. Man taucht das Ende des einen Rohres in die Eisenchlorürlösung ein, macht den Quetschhahn auf, damit das Vakuum die Eisenchlorürlösung in den Kolben übersaugt und schließt wieder den Hahn, sobald 20 ccm übergesaugt worden sind. Hierauf ersetzt man das Glas mit Eisenchlorür durch ein Glas mit ausgekochtem Wasser und läßt das Rohrende nicht senkrecht in das Wasser hängen, sondern schief, so daß die spezifisch schwerere Eisenchlorürlösung aus der Röhre in das Wasser fließt und reines Wasser in das Rohr steigt. Dann taucht man das Rohr in ein mit Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,1 gefülltes Becherglas und läßt 20 ccm davon in den Kolben eintreten und zuletzt 3–4 ccm Wasser, um die Salzsäure zu verdrängen. Nun füllt man ein Eudiometerrohr mit ausgekochtem Wasser, stülpt es in einer pneumatischen Wanne oder in einer großen Schale mit ausgekochtem Wasser über das Ableitungsrohr und erhitzt den Kolben. Sobald die zusammengepreßten Schläuche sich aufzublähen beginnen, öffnet man den Quetschhahn des Ableitungsrohres und läßt das sich entwickelnde Stickoxyd in das Meßgefäß eintreten. Nachdem etwa die Hälfte der Flüssigkeit verdampft ist, findet keine merkliche Gas-

¹⁾ Schlösing, *Annalen de Chemie et de Phys.* (3) **40**, 479 (1850).

²⁾ Grandeau, *Analyse chimique appliquée*.

entwicklung statt und doch zeigt die braune Farbe der Lösung, daß Stickoxyd noch vorhanden ist. Um dieses zu gewinnen, entfernt man die Flamme, schließt den Quetschhahn und läßt abkühlen, wobei ein Vakuum entsteht, und der letzte Rest Stickoxyd geht leicht aus der Flüssigkeit. Man erhitzt wieder zum Sieden, öffnet den Quetschhahn, sobald der Schlauch sich zu blähen beginnt und setzt das Kochen fort, bis die Flüssigkeit im Kolben auf 10 ccm eingedampft ist. Nun entfernt man die Flamme, schließt den Quetschhahn und bringt das Maßgefäß mit dem Stickoxyd in einen Zylinder mit destilliertem Wasser. Am obersten Ende befestigt man einen großen Kork, so daß das Rohr im Wasser schwimmt, nach $\frac{1}{4}$ Stunde zieht man die Röhre mittels des Korkes so weit in die Höhe, daß das innere und äußere

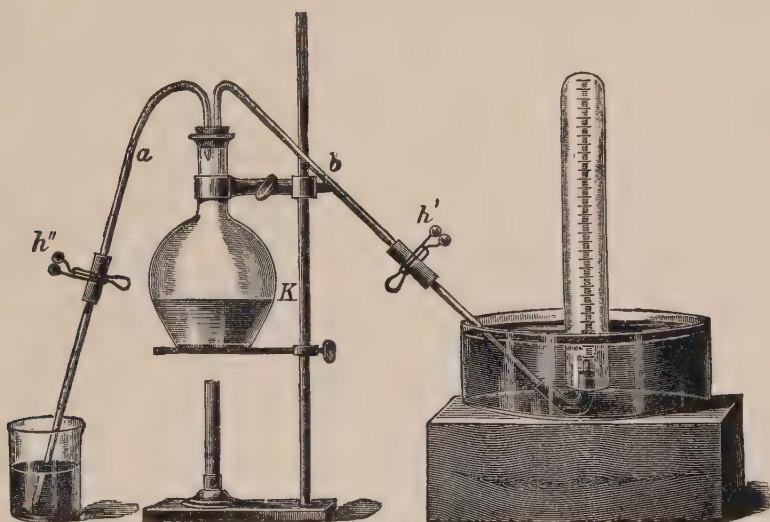


Fig. 3.

Niveau den gleichen Stand einnimmt und liest das Volumen ab. Man notiert die Temperatur des Wassers im Zylinder und den Barometerstand.

$$\text{Das reduzierte Volumen } V_0 = \frac{V(B - w) 273}{760 (273 + t)}$$

V_0 = das abgelassene Volumen NO, w die Wassertension bei t_1 und t_1 die abgelesene Temperatur.

Da 50 ccm einer empirisch normalen Kaliumnitratlösung 0,10116 g KNO_3 enthalten und diese 0,06201 g NO_3 entsprechen, so gibt V_0 ccm Stickoxyd 0,06201 g NO_3 an und das reduzierte Volumen

$$V'_0 = \frac{V'(B' - w') 273}{760 (273 + t')}$$

und da $V_0 : 0,06201 = V'_0 : X$,
so ist

$$X = \frac{V'_0 \times 0,06201}{V_0} = \text{g NO}_3$$

in 50 ccm Lösung.

Modifikation des Schlösingschen Verfahrens nach Stüber ¹⁾.

Da bei Anwendung von Natronlauge als Sperrflüssigkeit ein Fehler durch die Oxydation des Stickoxyds zu Salpetersäure durch sauerstoffhaltige Natronlauge entstehen kann, empfiehlt Stüber die als Sperrflüssigkeit angewandte 20prozentige Natronlauge $\frac{1}{4}$ Stunde zu kochen, schnell auf 45° C abzukühlen und sofort in das mit ausgekochtem Wasser ausgespülte Azotometer einzufüllen.

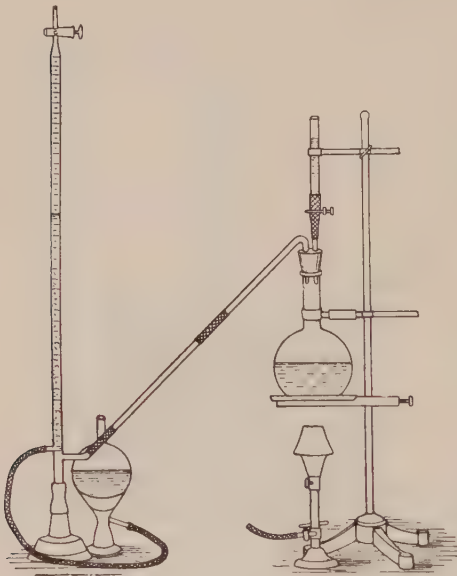


Fig. 4.
Azotometer nach Stüber.

Man bringt in ein 150 ccm fassendes Kölbchen (Fig. 4) 40 ccm einer gesättigten Eisenchloridlösung und ebensoviel 20prozentiger Salzsäure und läßt, nachdem der Zersetzungskolben luftleer gemacht worden und die Verbindung mit dem Azotometer hergestellt ist, die zu untersuchende, vorher ausgekochte Flüssigkeit durch einen Tropftrichter in die Eisenchloridlösung zufließen und spült den Tropftrichter zwei bis dreimal mit ausgekochter Salzsäure nach. Nachdem die Stickoxydentwicklung aufgehört hat, läßt man erkalten, wodurch ein Vakuum entsteht, und erhitzt nochmals den Kolben zum Sieden, wobei sich noch einige Blasen entwickeln. Hierauf schließt

man das Glasgefäß mit einem Stopfen, läßt das Azotometer 2 Stunden in einem Raum mit möglichst konstanter Temperatur stehen, stellt durch Heben oder Senken des Glasgefäßes ein gleiches Niveau her und reduziert das abgelesene Volumen auf 0° und 760 mm Barometerdruck.

b) Bestimmung durch Reduktion zu Ammoniak

a) in schwefelsaurer Lösung nach Ulsch ²⁾.

Die zu untersuchende Flüssigkeit wird in einem Kjeldahlkolben mit 10 ccm verdünnter Schwefelsäure (1 : 2) und 5 g Ferrum hydro-

¹⁾ W. Stüber, Zeitschr. f. Untersuchungen der Nahrungs- und Genußmittel **10**, 329 (1905).

²⁾ K. Ulsch, Chem. Zentralbl. **1890**, II, 926.

genio reductum versetzt und, um Verluste zu vermeiden, in den Hals des Kolbens eine birnförmige Glaskugel gebracht. Man erwärmt vorsichtig mit sehr kleiner Flamme und steigert die Hitze, wenn die anfangs stürmische Gasentwicklung nachgelassen hat: nach etwa $\frac{1}{2}$ Minute langem Sieden ist die Reduktion beendet. Nun verdünnt man mit 75—100 ccm Wasser, übersättigt mit 25—30 ccm Natronlauge (spezifisches Gewicht 1,34) und destilliert das gebildete Ammoniak in titrierte Schwefelsäure über. 1 ccm $\frac{1}{10}$ Normalschwefelsäure = 0,006305 g HNO_3 = 0,005404 g N_2O_5 .

β) in alkalischer Lösung.

Zur Reduktion der Salpetersäure in alkalischer Lösung sind folgende Reduktionsmischungen vorgeschlagen worden: J. König¹⁾ verwendet 18—20 g Kaliumhydroxyd, 75 ccm Alkohol und 8—10 g Zink- oder Eisenstaub; nach Böttcher²⁾ besteht die Mischung aus 80 ccm Natronlauge vom spezifischen Gewicht 1,3, je 5 g Zinkstaub und Eisenpulver; die von Stutzer vorgeschlagene Mischung besteht aus 25 ccm Natronlauge von 33° Bé und 3 g Aluminiumdraht oder Aluminiumblech, während Devardas³⁾ Gemisch auf 0,1 g Stickstoff 250 ccm Wasser, 5 ccm Alkohol, 50 ccm Kalilauge vom spezifischen Gewicht 1,3 und 2—2,5 g einer Legierung, die aus 45 Teilen Aluminium, 50 Teilen Kupfer und 5 Teilen Zink besteht, benötigt.

Die Ausführung der Bestimmung geschieht in der Weise, daß man die zu untersuchende Flüssigkeit mit einer der oben erwähnten Reduktionsmischungen in einem 400—500 ccm fassenden Erlenmeyerkolben versetzt und den Kolben mit einer in kaltes Wasser gestellten Peligotschen Röhre verbindet; die 200 ccm fassende Vorlage ist mit 10 ccm Normalschwefelsäure beschickt. Zur Vermeidung des Überspritzens von Kalilauge ist die Ableitungsröhre in der Kugel zu einer feinen Spitze umgebogen. Nun kann die Destillation sofort beginnen, aber zweckmäßig ist es, etwa 2—4 Stunden abzuwarten, bis die erste heftige Wasserstoffentwicklung vorüber ist, und dann mit einer kleinen Flamme zu destillieren, so daß nur Tropfen für Tropfen übergehen, bis aller Alkohol und etwa 100 ccm Wasser übergegangen sind. Der Überschuß der angewandten Schwefelsäure wird mit Alkalilauge zurücktitriert. 1 Teil Stickstoff entspricht 3,849 Teilen Salpetersäure (N_2O_5).

γ) in salzsaurer Lösung nach Krüger⁴⁾.

Die Überführung der Salpetersäure in Ammoniak geschieht in salzsaurer Lösung mittels Zinnchlorür und Zinkstaub in der Weise, daß man die zu untersuchende Flüssigkeit mit 10 ccm einer 150 g

¹⁾ J. König, Repertorium f. analytische Chemie **3**, 1 (1883).

²⁾ O. Böttcher, Landwirtschaftliche Versuchsstationen **41**, 165 (1892).

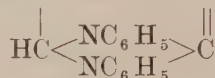
³⁾ Devarda, Chemiker-Zeitung **1893**, 1952.

⁴⁾ M. Krüger, Chemische Berichte **27**, 1633 (1894).

Zinn im Liter enthaltenden stark salzsauren Lösung und etwas Zinkstaub versetzt und mit kleiner Flamme erhitzt, bis sich der Zinkstaub in der schwach siedenden salzsauren Zinnchlorürlösung gelöst hat, wobei die Reduktion der Salpetersäure zu Ammoniak vollendet ist. Die so erhaltene Lösung wird verdünnt, mit Kalilauge im Überschuß versetzt und in bekannter Weise destilliert.

c) Gewichtsanalytische Bestimmung der Salpetersäure mittels Nitron nach Busch ¹⁾.

Diese Methode beruht auf der Eigenschaft des Nitrons, des Diphenylendianilodihydrotriazol, $C_{20}H_{16}N_4 = C_6H_5 - N \text{ ————— } N - C_6H_5$, ein



sehr schwer lösliches Nitrat zu bilden.

Man erhitzt die zu untersuchende Substanz in Lösung oder die Flüssigkeit in einem Becherglas zum Sieden, versetzt mit 10—12 Tropfen verdünnter Schwefelsäure und der gleichen Menge einer Lösung von 1 Teil Nitron in 20 Teilen 5prozentiger Essigsäure, rührt mit einem Glasstab um und läßt stehen, wobei nach etwa $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ Stunde das Nitronnitrat sich in prächtigen, seideglänzenden dünnen Nadeln auszuschcheiden beginnt und nach zweistündigem Stehen in Eiswasser vollständig ausfällt. Die Kristalle spült man mittels der Mutterlauge in einen bei 105—110° C getrockneten und dann gewogenen Neubauer-tiegel, wäscht mit 10 ccm Eiswasser nach und trocknet bei 105—110° C bis zur Gewichtskonstanz.

375 Teile Nitronnitrat = 63 Teilen HNO_3 resp. 54 Teilen N_2O_5 , oder Nitronnitrat $\times 0,168 = HNO_3$ und Nitronnitrat $\times 0,1415 = N_2O_5$.

Sind Jodide zugegen, die mit Nitron ebenfalls eine schwer lösliche Verbindung geben, müssen diese zuerst durch Jodat zerstört werden.

IV. Bestimmung der stickstofffreien Extraktivstoffe.

Unter stickstofffreien Extraktivstoffen versteht man den Rest, der sich aus der Differenz zwischen dem Gesamtgewicht eines Stoffes und der Summe von Wasser, Rohprotein, Fett, Rohfaser und Asche ergibt.

1. Bestimmung der in Wasser unlöslichen Stoffe.

Man zieht 20 g lufttrockene, entfettete Substanz mehrmals durch öfteres Schütteln mit je 200 ccm Wasser von gewöhnlicher Temperatur oder von 30° C, oder schüttelt am besten die Substanz in einer dickwandigen Flasche mit gutem Verschuß mit 800 ccm Wasser in der Schüttelmaschine, in beiden Fällen unter Zusatz von etwas Chloroform.

¹⁾ M. Busch, Gravimetrische Bestimmung der Salpetersäure. Chemische Berichte **38**, 861 (1905). — A. Gutbier, Die gewichtsanalytische Bestimmung der Salpetersäure mittels Nitron nach Busch. Zeitschr. f. angew. Chemie **18**, 494 (1905).

Hierauf filtriert man durch ein Filter oder Goochtiiegel mit Asbest, wäscht den Rückstand gut nach, dampft das Filtrat bis zur Trockne ein, trocknet bei 105° C und wägt.

2. Bestimmung der wasserlöslichen Kohlehydrate.

Man verfährt in derselben Weise wie bei den wasserlöslichen Stoffen, mit dem Unterschiede, daß man das Filtrat zum Kochen erhitzt, wobei sich eventuell Eiweiß ausscheidet, das man abfiltriert, das Filtrat einengt, auf ein bestimmtes Volumen auffüllt, einen aliquoten Teil bis zur Trockne eindampft, bei 105° C trocknet und wägt, dann versacht und wägt — die Differenz beider Wägungen ergibt die Menge wasserlöslicher Kohlehydrate.

3. Trennung der Dextrine von den Zuckerarten.

Etwa 200 ccm des wässrigen Auszuges, der die Gesamtmenge der wasserlöslichen Kohlehydrate enthält, wird in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade fast bis zur Trockne eingedampft, der Sirup in 10—20 ccm warmem Wasser gelöst und die Lösung unter fortwährendem Umrühren allmählich mit 100—200 ccm 95prozentigem Alkohol versetzt, wodurch die Dextrine ausfallen. Hierauf filtriert man die fast klare alkoholische Lösung in eine Porzellanschale und wäscht den Rückstand in der ersten Schale unter Reiben mit einem Pistill mehrmals mit kleinen Mengen Alkohol (1 Volumen Wasser und 10 Volumen Alkohol von 95 Proz.) aus. Der Rückstand wird in 10 ccm Wasser gelöst, in derselben Weise mit Alkohol gefällt, in heißem Wasser gelöst und die darin enthaltenen Dextrine bestimmt.

a) Traubenzucker.

Quantitative Bestimmung des Zuckers. Die Bestimmung des Zuckers kann auf chemischem Wege oder durch Polarisation geschehen. Bei der Bestimmung auf chemischem Wege durch Reduktion der Fehlingschen Lösung kommt das titrimetrische und gewichtsanalytische Verfahren in Betracht. Es ist noch eine ganze Reihe von Reduktionsmethoden in Vorschlag gebracht worden, die beim Harn ausführlich besprochen sind. Zur Bestimmung des Zuckers in eiweißhaltigen Flüssigkeiten muß das Eiweiß zuerst entfernt werden (siehe bei Blut).

Die zu untersuchende Zuckerlösung darf nicht weniger als 0,5 Proz. und nicht mehr als 1 Proz. Zucker enthalten.

b) Zuckerbestimmung nach Allihn.

Man erhitzt in einer Porzellanschale 60 ccm Fehlingsche Lösung und 60 ccm Wasser zum Sieden, fügt 25 ccm Zuckerlösung hinzu und erhält die Mischung 2 Minuten lang im Kochen. Die heiße Flüssigkeit

filtriert man durch ein Asbestfilterröhrchen oder einen Goochtiiegel, wäscht den Niederschlag mit heißem Wasser, dann mit Alkohol und Äther nach. Das Filterröhrchen wird nach dem Trocknen mit dem Wasserstoffapparat verbunden, das Kupferoxydul im Wasserstoffstrom reduziert und nach dem Erkalten gewogen. — Den Tiegel erhitzt man bis zur Rotglut, entfernt die Flamme und gießt durch die Öffnung im Deckel mittels einer Pipette 1 bis 2 ccm Methylalkohol zu, läßt erkalten und wägt.

Die dem gefundenen Kupfer entsprechende Menge Traubenzucker ist in besonderen Tabellen berechnet.

c) Gewichtsanalytische Bestimmung nach Pflüger ¹⁾.

Die hierzu erforderlichen Lösungen werden nach Fehling-Soxhlet dargestellt, mit dem Unterschiede, daß Pflüger bei der Seignettesalzlösung statt Natriumhydroxyd 125 g Ätzkali (208 ccm einer 60prozentigen Kalilauge) anwendet.

Abdestillerröhrchen. Ein Glasrohr von 10 cm Länge und 1,7 lichter Weite läuft nach unten in eine Verjüngung und darauffolgende birnenförmige Erweiterung von etwa 1 cm äußerem Durchmesser aus. An diese Erweiterung schließt sich abermals nach einer Verjüngung das 6 cm lange Abflußrohr. Die kleine Birne enthält den Asbest, der die Form und Größe einer großen Erbse hat, langfaserig und weich sein muß, nach mehrtägigem Liegen in roter rauchender Salpetersäure mit destilliertem Wasser bis zum Verschwinden der Trübung beim Umrühren gewaschen und getrocknet wird. Die so erhaltenen langfaserigen Stränge zerteilt man auf einer Glasplatte mit Präpariernadeln in einzelne Fäden oder Faserbündel, vereinigt sie zu einem Haufen, schiebt sie mit einer Pinzette in das Röhrchen und mit einem Draht durch die Verjüngung in die Birne. Der Asbestfilz darf weder zu locker noch zu dicht sein. Um das Röhrchen auf seine Brauchbarkeit zu prüfen, saugt man heißes, mit dem gleichen Volumen kalten Wassers verdünntes Gemisch gleicher Teile der Fehlingschen Lösung, wäscht mit 100 ccm Wasser aus, gießt Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,4 auf und läßt langsam filtrieren, wäscht dann mit Wasser, absolutem Alkohol und Äther, trocknet bei 100° C und wägt. Dieser Versuch wird wiederholt, bis der Gewichtsverlust bei zwei aufeinanderfolgenden Wägungen 0,2—0,3 mg nicht übersteigt. Ein solches Röhrchen ist für viele Versuche zu benutzen.

Um die Dichtigkeit zu prüfen, macht man zwei Parallelbestimmungen, die denselben oder fast denselben Wert ergeben müssen.

Man läßt aus einer Bürette 30 ccm Seignettesalzlösung und 30 ccm der Kupferlösung in ein 300 ccm fassendes Becherglas fließen und fügt unter rotierender Bewegung 85 ccm der vorher genau neutralisierten Zuckerlösung hinzu, wobei das Gesamtvolumen 145 ccm betragen muß. Das mit einem Uhrglas bedeckte Becherglas wird in einen an einem Stativ befestigten Ring eingehängt und zur Hälfte in ein siedendes Wasserbad eingetaucht; man läßt es darin genau 30 Minuten, versetzt sofort nach dem Herausnehmen aus dem Wasserbade mit 130 ccm kaltem Wasser, saugt durch das Asbeströhrchen so, daß sich stets Flüssigkeit im Röhrchen befindet. Man gießt zuerst die überstehende blaue Flüssigkeit hinein, läßt an einem den Boden berührenden Glasstab 100 ccm Wasser in das Becherglas fließen, so daß der Niederschlag nicht aufgerührt wird, gießt dieses Wasser ebenfalls auf das

¹⁾ E. Pflüger, Untersuchungen über die quantitative Analyse des Traubenzuckers. Pflügers Archiv 69, 399 (1898).

Filter und bringt nun mit Hilfe der Spritzflasche und eines Pinsels das Kupferoxyd quantitativ in das Röhrchen. Die Spritzflasche ist mit $2\frac{1}{2}$ m langen, über die Enden der beiden Glasröhren der Flasche gezogenen Gummischläuchen versehen. Der Gummischlauch, durch den das Wasser ausgespritzt wird, trägt eine in eine feine Spitze ausgezogene Glasröhre; diesen nimmt man in die rechte Hand und lenkt den Wasserstrahl gegen den Boden des mit der linken Hand umgekehrt über dem Trichter des Asbeströhrchens gehaltenen Becherglases. Das Ende des anderen Schlauches nimmt man in den Mund, um den notwendigen Druck hervorzubringen, und spült sorgfältig das Kupferoxydul bis auf die letzten Stäubchen auf das Filter. Nachdem das Wasser abgelaufen ist, wäscht man zweimal mit absolutem Alkohol und zweimal mit Äther aus, trocknet die Röhrchen bei $100-120^{\circ}$ C eine halbe Stunde, läßt im Exsikkator erkalten und wägt. Die der gefundenen Menge Kupferoxydul entsprechende Menge Traubenzucker erfährt man aus der von Pflüger zusammengestellten Tabelle.

d) Maßanalytische Methode nach Fehling-Soxhlet¹⁾.

Erforderliche Lösungen. Die Fehlingsche Lösung wird in folgender Weise dargestellt: 1. chemisch reines Kupfersulfat wird einmal aus verdünnter Salpetersäure, dreimal aus Wasser umkristallisiert, zwischen Filtrierpapier abgepreßt, 12 Stunden an der Luft liegen gelassen und davon 34,630 g zu 500 ccm gelöst.

2. Die Seignettesalzlösung erhält man durch Auflösen von 173 g dreimal umkristallisiertem, weinsaurem Kalium-Natrium (Seignettesalz) in 400 ccm Wasser und Versetzen mit 100 ccm Natronlauge, die 516 g Natriumhydroxyd im Liter enthält.

Zur Bestimmung werden 25 ccm der Kupferlösung und 25 ccm Seignettesalzlösung in einer tiefen Porzellanschale oder in einem Erlenmeyerkolben gemischt, zum Kochen erhitzt und von der Zuckerlösung portionsweise so lange zugesetzt, bis die Flüssigkeit nach 2 Minuten langem Kochen nicht mehr blau erscheint. Durch diese Vorprobe stellt man den Zuckergehalt der Lösung annähernd fest; man verdünnt sie nun so weit, daß sie ca. 1 Proz. Zucker enthält. Die Lösung ist einprozentig, wenn 23,7 ccm derselben für 50 ccm Fehlingsche Lösung verbraucht werden.

Nun kocht man wieder 50 ccm der Fehlingschen Lösung mit 23 ccm der fast einprozentigen Zuckerlösung (bei Glukose, Invertzucker und Galaktose 2, bei Maltose 4, bei Milchzucker 6 Minuten), filtriert durch ein doppeltes Faltenfilter, säuert 5 ccm des Filtrates mit Essigsäure an und versetzt mit Ferrozyankalium, wobei in Gegenwart von viel Kupfer dunkelrote Färbung, bei Spuren von Kupfer Rosafärbung auftritt, während Farblosigkeit auf vollständige Reduktion deutet. Ist noch Kupfer in der Lösung vorhanden, so nimmt man zu einem neuen Versuch eine größere Menge Flüssigkeit; war das Filtrat kupferfrei, so nimmt man 1 ccm Zuckerlösung weniger

¹⁾ Soxhlet, Das Verhalten der Zuckerarten zu alkalischen Kupferlösungen. Journ. f. prakt. Chemie **21**, 227 (1880).

und fährt mit der Anstellung solcher Versuche so lange fort, bis bei zwei Versuchen, in denen nur um 0,1 ccm verschiedene Mengen Zuckerlösung angewendet wurden, von den Filtraten das eine kupferhaltig, das andere kupferfrei ist. Die zwischen beiden liegende Quantität darf als die zur Zersetzung von 50 ccm Fehlingscher Lösung notwendige angesehen werden.

Das Reduktionsverhältnis zwischen Kupfersalz und Zucker ist abhängig von der Konzentration der aufeinander einwirkenden Lösungen und von der Menge des in Lösung befindlichen Kupfers; bei einprozentigen Zuckerlösungen, Vermeidung eines Kupferüberschusses und 2 Minuten langem Kochen während der Reaktion entsprechen

	0,5 g Traubenzucker	105,2 ccm Fehlingscher Lösung,
	0,5 g Invertzucker	101,2 ccm „ „
oder	50 ccm Fehlingscher Lösung	0,2375 g Traubenzucker,
	50 ccm „ „	0,2470 g Invertzucker,
	50 ccm „ „	0,2572 g Fruktose,
	50 ccm „ „	0,3890 g Maltose,
	50 ccm „ „	0,3380 g Laktose (krist.).

Soxhlet führt folgendes Beispiel an:

Verbraucht	23 ccm, Filtrat blaugrün, fehlt an Zucker.
„	24 ccm, Filtrat grünlich, fehlt immer noch.
„	25 ccm, Filtrat gelb, keine Kupferreaktion, wahrscheinlich zu viel Zucker und der Wert liegt in der Mitte.
„	24,5 ccm, Filtrat gelb, deutliche Kupferreaktion,
„	24,7 ccm, Filtrat gelb, schwache „
„	24,8 ccm, Filtrat gelb, keine „

mithin ist 24,75 ccm diejenige Menge, in der 0,2375 g Traubenzucker enthalten sind. Die Berechnung findet unter Berücksichtigung der Verdünnung statt.

e) Fruktose.

Quantitative Bestimmung. Die Bestimmung mit Fehlingscher Lösung geschieht in derselben Weise wie bei Glukose.

Die zum Nachweis von Fruktose dienende Methylphenylhydrazinprobe beruht darauf, daß sie zum Unterschied von anderen Glykosen bei Gegenwart von Essigsäure in der Wärme ein schwer lösliches Osazon liefert. Man erwärmt auf dem Wasserbade eine konzentrierte Fruktoselösung (10—11 ccm) mit der mehr als berechneten Menge Methylphenylhydrazin und soviel Alkohol, als zur klaren Lösung genügt, und 4 ccm einer 50prozentigen Essigsäure 5—10 Minuten lang und läßt bis zum nächsten Tage stehen, wobei sich das Osazon in gelbroten Nadeln abscheidet. Es schmilzt im reinen Zustande bei 158—160° C und dreht rechts (Neuberg).

f) Galaktose.

Quantitative Bestimmung ¹⁾. Man übergießt 5 g der zu prüfenden Substanz in einem Becherglase von 5 ccm Durchmesser und

¹⁾ W. Kent und B. Tollens, Untersuchungen über Milchzucker und Galaktose. *Annal. d. Chem.* **227**, 221 (1885). — J. Lindsey und B. Tollens, Über Holzsulfithlüssigkeit und Lignin. *Annal. d. Chemie* **267**, 348 (1892). —

7—8 cm Höhe mit 60 cm Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,15 und erhitzt unter Umrühren im Wasserbade, bis die anfänglich 2,5 cm betragende Höhe der Flüssigkeit auf möglichst genau $\frac{1}{3}$, also auf 8—9 mm abgedampft ist, läßt bis zum nächsten Tage stehen, verrührt mit Wasser, saugt die Schleimsäure ab, trocknet und wägt. Bei Gegenwart von Zellulose, Kalksalzen kocht man zur Entfernung der Beimengungen den Absatz mit Wasser und Natrium- oder Ammoniumkarbonat, saugt die Flüssigkeit vom Ungelösten ab, dampft sie auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz ein, fällt die Schleimsäure durch Versetzen mit Salpetersäure. Die abfiltrierte Schleimsäure wird getrocknet und gewogen und auf den Schmelzpunkt geprüft. Da Galaktose annähernd 75 Proz. ihres Gewichtes an Schleimsäure liefert, multipliziert man die letztere mit $\frac{4}{3}$, um das Gewicht der Galaktose zu erfahren.

g) Invertzucker.

Bestimmung des Invertzuckers nach Meissl. 25 cm Kupfersulfatlösung, 25 cm Seignettesalznatronlauge (man löst 73 g Seignettesalz in 400 cm Wasser, fügt 100 cm Lauge hinzu, die nach Soxhlet 516 g NaOH im Liter enthält) und so viel Invertzuckerlösung, als im Höchstbetrage 0,245 g Invertzucker entsprechen, und bringt das Ganze auf 100 cm. Die zum Sieden erhitzte Flüssigkeit wird 2 Minuten im Sieden erhalten.

h) Glukuronsäure.

Nachweis. Die zu untersuchende Glukuronsäureflüssigkeit wird mit etwas einer siedend heißen Lösung von 5 g salzsaurem p-Bromphenylhydrazin und 6 g Natriumazetat auf dem Wasserbade auf 60° C gebracht. Nach etwa 5 bis 10 Minuten scheiden sich gelbe Nadeln, die abfiltriert werden; das Filtrat wird weiter erhitzt, wodurch wieder Kristalle ausfallen. Die Kristalle werden mit warmem Wasser und mit absolutem Alkohol gewaschen und aus 60 prozentigem Alkohol umkristallisiert; sie schmelzen bei 236° C. Die Drehung in einer Lösung von 0,2 g in 6 cm absolutem Alkohol und 4 cm Pyridin ist 7,42°, was einer spezifischen Drehung $[\alpha]_D = -369^\circ$ entspricht.

Über die Phlorogluzin-, Orzin- und andere Proben sowie über die quantitative Bestimmung siehe bei Pentosen und bei Harn.

Bei Gegenwart von Pentosen, die im Harn, Organen usw. oft neben Glukuronsäure vorkommen, versagt die Furfurol-Phlorogluzinmethode, da man nicht wissen kann, aus welcher Substanz das Furfurol stammt. Für solche Fälle haben Léfèvre und Tollens¹⁾ die Furfurol-Phlorogluzidmethode derart modifiziert, daß die bei der Reaktion entstehende Kohlensäure aufgefangen und gewogen wird, während Furfurol zurückbleibt.

Man kocht die zu untersuchende Substanz mit 100 cm Salz-

P. Rischbiet und B. Tollens, Versuche mit Melasse und Baumwollraffinose. *Annal. d. Chemie* **232**, 1875 (1885).

¹⁾ K. Léfèvre und B. Tollens, Untersuchungen über die Glukuronsäure, ihre quantitative Bestimmung und ihre Farbenreaktionen. *Zeitschr. des Vereins deutscher Zuckerindustr.* **1907**, 1097.

säure vom spezifischen Gewicht 1,06 im Destillationskolben *a*, der mit einem Rückflußkühler *b* versehen ist, um das Übergehen von kondensierbaren Dämpfen zu verhindern (s. Fig. 5). Das entstehende Furfurol und die Salzsäure fließen dabei zurück und die Flüssigkeit färbt sich durch das verharzte Furfurol braun, während die Kohlensäure durch das verharzte Furfurol *c*, durch ein Chlorkalziumrohr *d* in einen gewogenen Kaliapparat *e* geleitet wird, indem man während der Reaktion mittels eines Aspirators *g* durch den Apparat einen langsamen gereinigten Luftstrom durchsaugt.

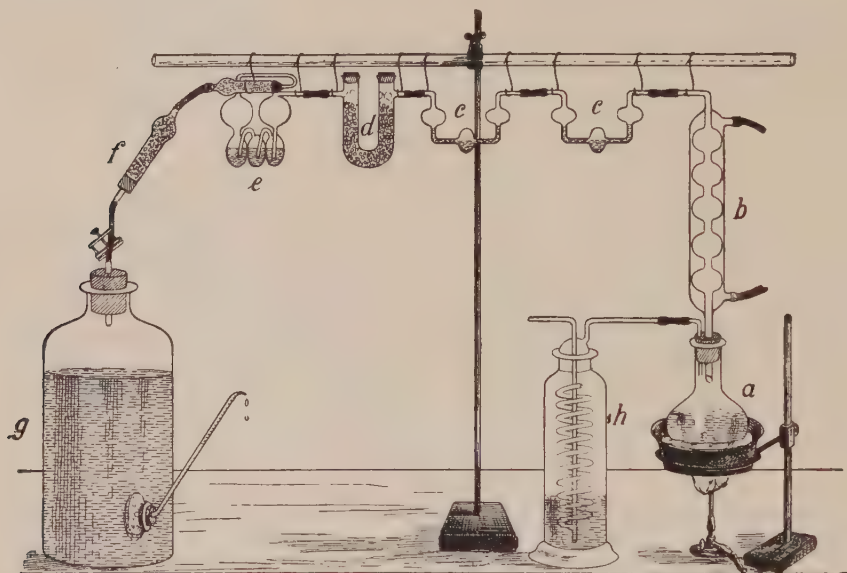


Fig. 5.
Apparat zur Glukuronsäure-Bestimmung mittels der durch Salzsäure entwickelten Kohlensäure nach K. Lefevre und B. Tollens.

Da das Glukuronsäurelaktone der Theorie nach 25 Proz. seines Gewichtes an CO_2 entwickelt, so muß man die Gewichtszunahme des Kaliumapparates mit 4 multiplizieren. Bei einem Gemenge von Pentosen resp. Pentosanen und Glukuronsäure bestimmt man durch Furfurol-Salzsäuredestillation die Furfurol-Phlorogluzidmenge, dann bestimmt man durch Kochen mit Salzsäure die vom Glukuron stammende Kohlensäure — die Multiplikation mit 4 ergibt die Menge Glukuron und die Division durch 3 die entsprechende Menge Furfurol-Phlorogluzid: $\text{CO}_2 \times \frac{4}{3} = \text{Phlorogluzid aus Glukuron}$. Zieht man dieses Phlorogluzid von dem aus Pentose + Glukuron ab, so erhält man das Pentosen-Phlorogluzid und aus diesem nach der Tabelle die Pentosane.

i) Rohrzucker (Saccharose).

Quantitative Bestimmung. 1. Saccharose. Die Saccharose bestimmt man gewöhnlich entweder aus dem spezifischen Gewicht, durch Polarisation oder nach der Invertmethode.

a) Das spezifische Gewicht der Zuckerlösung bestimmt man mittels des Pyknometers, der Westphal-Mohrschen Wage oder der Aräometer, nach denen der Zuckergehalt direkt von der Skala abgelesen wird.

b) Polarisation. Die Lösungen müssen absolut klar und farblos sein. Man versetzt 100 ccm Zuckerlösung mit 10 ccm Bleiessig und filtriert. Zur Polarisation verwendet man entweder ein 220-mm-Rohr oder vermehrt die im 200-mm-Rohr abgelesenen Polarimetergrade um $\frac{1}{10}$.

Die spezifische Drehung der Saccharose beträgt bei $17,5^{\circ} = +66,5^{\circ}$. 1° Drehung im 200-mm-Rohr bei $17,5^{\circ}$ entspricht im Polarisationsapparate von:

	Saccharose in 100 ccm
Mitscherlich, Laurent, Schmidt und Hänsch, Wild mit Kreisteilung	0,75 g
Soleil-Ventzke-Scheibler, Schmidt und Hänsch mit Zuckerskala	0,26084 g
Soleil-Dubosq mit Zuckerskala	0,16350 g.

Bei Normallösungen (z. B. 6,35 g in 100 ccm) entsprechen die gefundenen Grade Prozenten Zucker.

Für die Umrechnung der Drehungswerte der verschiedenen Polarisationsapparate benutzt man folgende Zusammenstellung (Frühling 1903, 54):

1° Ventzke-Scheibler-Soleil	=	$1,5932^{\circ}$ Laurent,
1° „ „	=	$0,3469^{\circ}$ Wild (Kreisgrade),
1° Laurent	=	$0,2167^{\circ}$ Wild,
1° „	=	$0,6277^{\circ}$ Ventzke,
1° Wild (Kreisgrad)	=	$4,6147^{\circ}$ Laurent,
1° „ „	=	$2,8827^{\circ}$ Ventzke,
1° „ „	=	$7,5281^{\circ}$ Wild (Zuckerskala),
1° Wild (Zuckerskala)	=	$0,1328^{\circ}$ Wild (Kreisgrade).

c) Inversionsmethode. Man bestimmt den Zuckergehalt zunächst durch Polarisation, invertiert und polarisiert wieder bei 20° . Die Inversion führt man aus, indem man 13,024 g in 75 ccm Wasser löst, 5 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,188 hinzufügt, im Wasserbade auf $67-70^{\circ}$ (2—3 Minuten) erwärmt und auf dieser Temperatur noch 5 Minuten erhält; hierauf kühlt man rasch ab und füllt auf 100 ccm auf.

Die Berechnung geschieht nach folgender Formel:

$$R = \frac{100 S}{142,66 - \frac{1}{2} t},$$

wo R den Zuckergehalt, S die Summe der Ablenkung vor und nach der Inversion mit Weglassung des linken Vorzeichens und t die Temperatur in Graden Celsius.

2. Bestimmung des Invertzuckers im Rübenzucker nach Herzfeld. 25 ccm der Probe werden mit Bleiessig zu 100 ccm gelöst, 60 ccm des Filtrats mit kohlensaurem oder schwefelsaurem Natrium versetzt und zu 75 ccm aufgefüllt; hiervon werden 50 ccm mit 50 ccm Fehlingscher Lösung zum Kochen erhitzt, 2 Minuten gekocht, das ausgeschiedene Kupferoxydul als Kupfer gewogen und die entsprechende Menge Zucker wird daraus berechnet.

3. Bestimmung des Rohrzuckers durch Reduktion mit Fehlingscher Lösung. Der Bestimmung muß die Inversion mittels Salzsäure (s. Invertzucker) oder Invertase vorangehen. Beim gewichtsanalytischen Verfahren muß man das berücksichtigen, daß die Invertzuckerlösung in 50 ccm nicht mehr als 0.245 g Invertzucker entsprechend 0.233 g Saccharose enthalten darf. Zu diesem Zwecke erwärmt man 100 ccm der nicht über einprozentigen Saccharoselösung in einem Kolben im kochendem Wasserbade $\frac{1}{2}$ Stunde lang mit 30 ccm einer $\frac{1}{10}$ Normal-salzsäure, läßt erkalten und fügt die gleiche Menge $\frac{1}{10}$ Normalkalilauge hinzu und füllt auf 250 ccm mit Wasser auf. In 50 ccm dieser Lösung wird der Invertzucker nach Meissl bestimmt (siehe dort).

k) Maltose.

Bestimmung der Maltose nach E. Wein. 25 ccm Kupfer-sulfatlösung, 25 ccm Seignettesalz-Natronlauge (nach Soxhlet) und 25 ccm der nicht mehr als einprozentigen Zuckerlösung zum Sieden erhitzt und im Sieden 4 Minuten erhalten. Berechnung nach der Tabelle.

Bei Anwendung der Titriermethode nach Soxhlet erhitzt man 9.5 g Saccharose in 700 ccm Wasser gelöst mit 100 ccm $\frac{1}{5}$ Normal-salzsäure $\frac{1}{2}$ Stunde im siedenden Wasserbade, läßt erkalten, neutralisiert die Lösung genau mit titrierter Normallauge und füllt zum Liter auf. Die so erhaltene Invertzuckerlösung ist weniger als einprozentig.

l) Raffinose.

Quantitative Bestimmung. Man löst nach Herzfeld und Dammüller 13.024 g Substanz (n 2 Gewicht für den Soleil-Ventzke-Scheibler-Apparat) in 75 ccm Wasser und erwärmt mit 5 ccm einer 38.8prozentigen Salzsäure $7\frac{1}{2}$ –10 Minuten auf 67–70° C. Nach dem Erkalten füllt man zur Marke auf, reinigt mit mittels Salzsäure gewaschener Tierkohle und führt die Beobachtung bei 20° C aus. Zur Berechnung dienen folgende zwei Formeln

$$Z (\text{Saccharose}) = \frac{0.5182 - P - J}{0.8390} \text{ und } R (\text{Raffinose}) = \frac{P - Z}{1.852},$$

wo P = direkte Polarisation, I = Polarisation nach der Inversion für das ganze Normalgewicht mit Umkehrung des Vorzeichens bedeutet.

m) Pentosen und Pentosane.

Quantitative Bestimmung. Die Pentosen werden ähnlich allen reduzierenden Zuckerarten mittels der Fehlingschen Lösung in der angegebenen Weise bestimmt.

Für die gewichtsanalytische Bestimmung nach Allihn wendet man an:

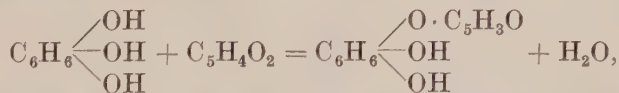
35 ccm Kupfersulfatlösung.

35 ccm Seignettelösung.

25 ccm einer $\frac{1}{4}$ bis 1 prozentigen Pentosenlösung erhitzt 4 Minuten lang und erhält 3 Minuten im Kochen.

1,0 g Arabinose scheidet nach Lippmann aus 100 ccm unverdünnter Fehlingscher Lösung eine 1,832 g Cu entsprechende Menge Oxydul ab. 1 ccm Fehlingscher Lösung wird nach Bauer von 0,004303 g Arabinose reduziert. Nach Stone entspricht 1 mg Arabinose 1,945—2,000 mg Kupfer, 1 mg Xylose 1,864—1,959 mg Kupfer, wenn man 25 ccm der 1— $\frac{1}{4}$ prozentigen Zuckerlösung mit 70 ccm Fehlingscher Lösung 4 Minuten lang kocht. Weiser und Zait-schek erhielten wesentlich andere Reduktionswerte; sie wendeten aber eine Lösung nach Meissl-Allihn für die Glukosebestimmung an und erhitzten die 145 ccm betragende Lösung nach dem Vorschlage Pflügers 30 Minuten im siedenden Wasserbade. Aus ihren Werten ergibt sich, daß die Arabinose etwas schwächer, die Xylose etwas stärker als die Glukose reduziert; der Reduktionswert eines Gemisches von Arabinose und Xylose kann daher gleich dem Reduktionswert von Glukose gesetzt werden. Sind in einem Zuckergemisch von Hexosen auch Pentosen vorhanden, so kann man durch Destillation eines besonderen Teiles der Zuckerlösung mit Salzsäure das Furfurol und damit die Pentosen (Arabinose und Xylose) bestimmen und daraus die den letzteren entsprechende Menge Kupfer (Reduktionswert der Glukose) berechnen, und wenn diese von der ganzen Menge reduzierten Kupfers abgezogen wird, erhält man die der Glukose allein entsprechende Kupfermenge. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, daß auch die Hexosen (Glukose, Saccharose) nach Tollens bei der Destillation Furfurol liefern, z. B. reine Glukoselösungen 0,36 Proz. Furfurol oder 0,65 Proz. Pentosen. Diese Menge muß daher von der gefundenen Pentosemenge abgezogen und der Rest erst auf den Reduktionswert der Glukose umgerechnet werden, z. B. 50 ccm der zu untersuchenden Lösung sollen 296,4 mg Cu reduzieren = 142,4 mg Glukose; weitere 5 ccm sollen 8,4 mg Pentosen liefern. Da das aus 142,4 mg Glukose gebildete Furfurol auf Pentosen umgerechnet 1,0 mg beträgt, so ist der tatsächliche Pentosengehalt der Lösung $8,4 - 1,0 = 7,4$, also der wahre Gehalt an Glukose $142,4 - 7,4 = 135,0$ mg, und diese mit 0,9 multipliziert, liefert erst den der Glukose entsprechenden Stärkewert.

Furfurol-Salzsäuremethode von B. Tollens. Diese Methode besteht in der Überführung der Pentosen, Pentosane und Glukuronsäure durch Destillation mit Salzsäure in Furfurol und der Fällung des Furfurols im Filtrat mit Phlorogluzin im Sinne der Gleichung



so daß sich verhält Phlorogluzin : Phlorogluzid = 126 : 186.

Man bringt 5 g von der zu untersuchenden Substanz (Stroh, Holz, Gummi, Organe usw.) in einen 300 ccm fassenden Kolben, fügt 100 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,06 hinzu und destilliert aus einem Bade aus Rosemetall (1 Teil Blei, 1 Teil Zinn, 2 Teile Wismut), bis 30 ccm Flüssigkeit übergegangen sind, läßt durch eine

Hahnpipette 30 ccm derselben Salzsäure zufließen, destilliert wieder 30 ccm Flüssigkeit ab, läßt wieder Salzsäure nachfließen so lange, bis die Substanz vollständig zersetzt ist und kein Furfurol mehr übergeht, was bei etwa 400 ccm Destillat erreicht ist. Ob kein Furfurol mehr übergeht, sieht man beim Zusammenbringen eines Tropfens des Destillats mit Anilinzetat auf Filtrierpapier, wobei keine Rotfärbung mehr auftreten darf. Nun fügt man zum Destillat die doppelte Menge des zu erwartenden Furfurols an Phlorogluzin, in der oben angegebenen Salzsäure gelöst, hinzu, füllt auf 400 ccm mit der Salzsäure, wobei die Flüssigkeit gelb, dann grünlich und trübe wird, und läßt bis zum nächsten Tage stehen. Nachdem man geprüft hat, ob alles Furfurol gefällt ist, d. h. ob die überstehende Flüssigkeit Anilinzetatpapier nicht rötet, filtriert man durch einen mit Asbest beschickten, mit der Salzsäure (1,06) ausgewaschenen und geglühten Goochiegel, wäscht mit 150 ccm Wasser nach und trocknet bei 97° C etwa 4 Stunden und wägt nach dem Erkalten im Exsikkator.

Aus der Menge des gewogenen Niederschlages von Furfurol-Phlorogluzin, dem Phlorogluzid, berechnet man die Menge Furfurol. Bei kleinen Mengen Niederschlag durch Division mit 1,82, bei größeren Mengen durch Division mit 1,93, im Mittel mit 1,84. Genauere Divisoren, je nach der Menge des Niederschlages, gibt folgende Tabelle:

Erhaltene Phlorogluzid- menge g	Divisor für die Berech- nung auf Furfurol	Erhaltene Phlorogluzid- menge g	Divisor für die Berech- nung auf Furfurol
0,20	1,820	0,34	1,911
0,22	1,839	0,36	1,916
0,24	1,856	0,38	1,919
0,26	1,871	0,40	1,920
0,28	1,884	0,42	1,927
0,30	1,895	0,44	1,930
0,32	1,904	0,46	1,930

Aus dem Furfurol berechnet man dann die betreffenden Pentosane oder Pentosen wie folgt.

Pentosane.

(Furfurol — 0,0104) $\times$ 1,68 = Xylan.
 (Furfurol — 0,0104) $\times$ 2,07 = Araban.
 (Furfurol — 0,0104) $\times$ 1,88 = Pentosane (im allgemeinen).

Pentosen.

(Furfurol — 0,0104) $\times$ 1,91 = Xylose.
 (Furfurol — 0,0104) $\times$ 2,35 = Arabinose.
 (Furfurol — 0,0104) $\times$ 2,13 = Pentosen (im allgemeinen).

Methylpentosane.

Nachweis. Um die bei der Destillation mit Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,06 erhaltene Flüssigkeit auf die Gegenwart von Methylfurfurol zu prüfen, versetzt man in einem Reagenzrohre 5 ccm derselben mit dem gleichen Volumen konzentrierter Salzsäure, fügt etwas Phlorogluzin in salzsaurer Lösung

(spezifisches Gewicht 1,06) hinzu, läßt etwa 5 Minuten stehen, filtriert und prüft das Filtrat mit dem Spektroskop, das bei Gegenwart von Methylfurfurol die dunklen Bande im blauen Teile des Spektrums zeigt.

Quantitative Bestimmung. Die Methylpentosane liefern bei der Destillation mit Salzsäure Methylfurfurol, das durch Phlorogluzin ebenso wie das Furfurol quantitativ gefällt wird. Das Methylfurfurol-Phlorogluzid unterscheidet sich vom Furfurol-Phlorogluzid durch seine Löslichkeit in Alkohol. Man sammelt die Gesamtmenge des Phlorogluzids in einem Gooch'schen Tiegel, trocknet und wägt. Den Tiegelinhalt übergießt man dann in einem Gläschen mit 15 bis 20 ccm Alkohol, erwärmt im Wasserbade auf 60° C, saugt ab, behandelt ihn zwei- bis dreimal mit Alkohol, bis dieser sich nicht mehr färbt, läßt 2 Stunden trocknen und wägt und verascht. Die Differenz zwischen den Gewichten des Tiegels vor und nach der Veraschung gibt die Menge Furfurol-Phlorogluzid, die Differenz zwischen den Gewichten des Tiegels vor und nach dem Behandeln mit Alkohol gibt die Menge des Methylfurfurol-Phlorogluzids. Die Menge der Pentosen resp. Pentosane berechnet man nach der Tabelle S. 50, die Menge Methylpentose berechnet man aus der Menge Methylfurfurol-Phlorogluzid (Ph) nach folgender Gleichung, z. B.:

$$\text{Rhamnose} = \text{Ph } 1,65 - \text{Ph}^2 \cdot 1,84 + 0,010.$$

$$\text{Rhamnosan} = \text{Rhamnose} \times 0,8.$$

Phlorogluzid mg	Rhamnose mg	Fukose mg	Phlorogluzid mg	Rhamnose mg	Fukose mg
10	26,60	26,00	31	59,33	71,20
11	27,90	28,40	32	60,86	73,10
12	29,50	30,70	33	62,39	75,00
13	31,10	33,10	34	63,92	76,80
14	32,70	35,40	35	65,45	78,60
15	34,30	37,70	36	66,98	80,40
16	35,90	40,00	37	68,51	82,20
17	37,50	42,30	38	70,04	83,90
18	39,10	44,50	39	71,57	85,70
19	40,70	46,70	40	73,10	87,40
20	42,30	48,90	41	74,68	89,00
21	43,85	51,00	42	76,06	90,70
22	45,40	53,20	43	77,54	92,30
23	46,95	55,30	44	79,02	93,90
24	48,50	57,40	45	80,30	95,40
25	50,05	59,40	46	81,98	97,00
26	51,60	61,40	47	83,46	98,50
27	53,15	63,40	48	84,94	100,00
28	53,70	65,40	49	86,42	101,50
29	55,25	67,40	50	87,90	102,90
30	57,80	69,30			

$$\text{Fukosan} = \text{Fukose} \times 0,89.$$

4. Trennung der einzelnen Zuckerarten voneinander.

Die vereinigten alkoholischen Filtrate, die die Zuckerarten enthalten, werden durch vorsichtiges Erwärmen auf dem Wasserbade vom Alkohol be-

freit und zur Bestimmung und Trennung der Zuckerarten auf ein bestimmtes Volumen gebracht.

a) Bestimmung des Invertzuckers und Rohrzuckers nebeneinander.

Wenn Zuckerlösungen neben Invertzucker Rohrzucker enthalten und sie mit überschüssiger Fehlingscher Lösung erhitzt werden, so wird bedeutend mehr Kupferlösung reduziert, als wenn nur Lösungen von Invertzucker auf überschüssige Fehlingsche Lösung einwirken.

a) Bestimmung des Invertzuckers. Wenn daher in solchen Fällen der Invertzucker nach Meissl gewichtsanalytisch durch Kochen mit überschüssiger Kupferlösung bestimmt werden soll, so muß man Korrekturen anbringen, die je nach dem Verhältnis von Invertzucker zu Rohrzucker verschieden sind; doch sind die Reduktionsverhältnisse nur stark abweichend, wenn auf 10 Teile Invertzucker mehr als 90 Teile Rohrzucker vorhanden sind.

Wenn man aber bei Gegenwart von Rohrzucker den Invertzucker maßanalytisch nach Soxhlet bestimmt, also einen Überschuß von Kupferlösung vermeidet, so wirkt der Rohrzucker nicht vermehrend auf die Reduktion der Kupferlösung. Die Resultate der maßanalytischen Bestimmung des Invertzuckers sind daher auch bei der Gegenwart von Rohrzucker ebenso verwendbar wie bei Abwesenheit desselben.

b) Bestimmung des Rohrzuckers. Den neben Invertzucker vorhandenen Rohrzucker bestimmt man in der Weise, daß man einen anderen Teil der Lösung invertiert und nun die Summe des ursprünglich vorhandenen und des neugebildeten Invertzuckers gewichts- oder maßanalytisch bestimmt und hiervon den von der Inversion vorhandenen Invertzucker abzieht. Die übrigbleibende Invertzuckermenge, mit 0.95 multipliziert, ergibt die Menge des neben dem Invertzucker vorhandenen Rohrzuckers.

b) Bestimmung des Invertzuckers neben Dextrose bzw. anderer Zuckerarten nebeneinander.

Um zwei Zuckerarten nebeneinander zu bestimmen oder die Identität einer Zuckerart mit einer bekannten festzustellen, bedient man sich der Eigenschaft der Zuckerarten, Fehlingsche Kupferlösung und Sachs'sche Quecksilberlösung in verschiedenen, aber unter gleichen Arbeitsbedingungen konstanten Verhältnissen zu reduzieren. Die Ausführung der Zuckerbestimmung mit der Fehlingschen und Sachs'schen Lösung geschieht maßanalytisch nach Soxhlet¹⁾.

Für die Berechnung der Mengen der vorhandenen Zuckerarten hat Soxhlet gefunden, daß je 1 g der verschiedenen Zuckerarten in 1prozentigen Zuckerlösungen folgende Mengen Fehlingscher und Sachs'scher Lösungen reduziert, bzw. daß 100 ccm der letzteren (unverdünnt) durch nebenstehende Zuckermengen in 1prozentigen Lösungen reduziert werden:

Zuckerart	1 g Zucker in 1prozentiger Lösung reduziert		100 ccm der Lösungen von Fehling Sachsse werden reduziert in 1prozentiger Lösung durch	
	Fehlingsche Lösung ccm	Sachs'sche Lösung ccm	Fehling mg	Sachsse mg
Dextrose (Traubenzucker) . .	210,4	302,5	475,3	330,5
Invertzucker	202,4	376,0	494,1	266,0
Lävulose (Fructose)	194,4	449,5	514,4	222,5
Laktose	148,0	214,5	675,7	466,0
Desgleichen (nach der Inversion)	202,4	257,7	494,1	388,0
Galaktose	196,0	226,0	510,2	442,0
Maltose	128,4	197,6	778,8	506,0

Sachs'sche Quecksilberlösung. Man löst 18 g Quecksilberjodid (erhalten durch Fällung von Sublimatlösung mit Jodkalium) in Gegenwart von 25 g Jodkalium in Wasser, versetzt mit einer Lösung von 80 g Ätzkali in

¹⁾ Fr. Soxhlet, Journ. f. prakt. Chemie 21, 300 (1880).

Wasser und füllt auf 1000 ccm. Die Lösung enthält 7,9295 g Quecksilber im Liter.

Die Erkennung der Endreaktion geschieht in der Weise, daß man das Fortschreiten der Reduktion an einigen aus der Flüssigkeit entnommenen und mit alkalischer Zinnoxidullösung (hergestellt durch Übersättigen einer Lösung von Zinnchlorür mit Ätzkali) versetzten Tropfen verfolgt, wobei anfangs eine schwarze Fällung, dann eine braune Färbung entsteht; wenn alles Quecksilber ausgefällt ist, bleibt die Farbe unverändert.

Wenn man Zuckerlösungen von 1 Proz. Gehalt an zwei verschiedenen Zuckerarten, z. B. an Dextrose (durch Hydrolyse von Dextrin erhalten) und an Invertzucker (durch Inversion von Rohrzucker erhalten) einerseits mit Fehlingscher Lösung, andererseits mit Sachsse'scher Quecksilberlösung, wie vorstehend angegeben ist, titriert, so berechnet sich der Gehalt an Dextrose und Invertzucker aus den beiden Gleichungen:

$$ax + by = f \text{ und } Cx + dy = S,$$

worin a die Anzahl Kubikzentimeter Fehlingscher Lösung, die durch 1 g Glukose reduziert werden;

b die Anzahl Kubikzentimeter Fehlingscher Lösung, die durch 1 g Invertzucker reduziert werden;

C die Anzahl Kubikzentimeter Sachsse'scher Lösung, die durch 1 g Dextrose reduziert werden;

d die Anzahl Kubikzentimeter Sachsse'scher Lösung, die durch 1 g Invertzucker reduziert werden;

F die Anzahl der für ein Volumen der Zuckerlösung (etwa 100 ccm) verbrauchten Kubikzentimeter Fehlingscher Lösung;

S die Anzahl der für ein Volumen der Zuckerlösung (etwa 100 ccm) verbrauchten Kubikzentimeter Sachsse'scher Lösung.

x die Menge der gesuchten Dextrose in Gramm, enthalten in einem Volumen (100 ccm) der Zuckerlösung.

y die Menge des gesuchten Invertzuckers in Gramm, enthalten in einem Volumen (100 ccm) der Zuckerlösung.

Handelt es sich also um Bestimmung von Glukose und Invertzucker nebeneinander, so würden die angegebenen Formeln lauten:

$$210,4 x + 202,4 y = F,$$

$$302,5 x + 376,0 y = S.$$

Hieraus berechnet man die vorhandenen Dextrose- und Invertzucker-mengen in bekannter Weise.

c) Bestimmung von Rohrzucker, Dextrose, Fruktose, Maltose, Isomaltose und Dextrin nebeneinander.

Bei gleichzeitiger Anwesenheit dieser Zuckerarten und des Dextrins bestimmt man:

a) Das Reduktionsvermögen für Fehlingsche Lösung:

α) in der Lösung direkt;

β) nach der Inversion mit Invertin (bei 50°—55° C);

γ) in dem Gärrückstande, nach dem Vergären mit einer geeigneten, d. h. Maltose nicht vergärenden, reingezüchteten Weinhefe direkt;

δ) in dem nach je erhaltenen Gärrückstande nach der Inversion mit Salzsäure nach Sachsse mit 1, 2 und 3 Stunden Kochdauer;

b) Die Dextrine durch Alkoholfällung in der ursprünglichen Lösung.

Aus diesen Bestimmungen ergibt sich:

1. der Rohrzucker aus der Differenz von α und β;

2. die Summe von Dextrose und Fruktose aus der Differenz von α und γ.

3. die Summe von Maltose und Isomaltose aus der Differenz von δ und b.

4. der Gehalt an Dextrinen aus b.

Sind einzelne der angeführten Zuckerarten nicht zugegen, so können unter Umständen Vereinfachungen eintreten. Aus dieser Übersicht ergibt sich keine Trennung von Maltose und Isomaltose und keine Trennung von Dextrose und Invertzucker; auch ist keine Rücksicht genommen auf den Einfluß, den die

Gegenwart von Rohrzucker auf das Reduktionsvermögen anderer Zuckerarten ausübt. Eine wertvolle Ergänzung der gewichtsanalytischen Bestimmungen ergibt sich unter Umständen durch Heranziehung der polarimetrischen Zuckerbestimmung in den verschiedenen, in obigem Gang in Betracht kommenden Flüssigkeiten. Wenn demnach die Werte auch nur annähernde sind, so ist doch in allen Fällen, in denen Malzextrakt oder Stärkezuckersirup bzw. Most und Süßweine in Frage kommen, ein Bedürfnis für eine solche Trennung der Zuckerarten vorhanden, und für die meisten Fragen genügt die nach vorstehendem Verfahren zu erzielende Genauigkeit.

5. Stärke.

Quantitative Bestimmung. Die Bestimmung der Stärke geschieht 1. durch Abscheidung in Substanz, 2. durch Ermittlung des spezifischen Gewichts (in Vegetabilien) und 3. als Dextrose. Die ersten zwei Verfahren sind nur für die Technik geeignet.

Zur Bestimmung der Stärke als Dextrose hydrolysiert man sie am besten nach der Methode von Sachsse, indem man 2—3 g Substanz in einem Kolben mit 200 ccm Wasser und 20 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,125 3 Stunden am Rückflußkühler im Wasserbade kocht, mit Kalilauge oder Natriumkarbonat genau neutralisiert, auf ein bestimmtes Volumen auffüllt und die Dextrose bestimmt und nach $C_6H_{12}O_6 : C_6H_{10}O_5 = 180 : 162 = 111,1 : 100$ oder 10 : 9 auf Stärke umrechnet.

Sind auch andere Kohlehydrate oder auch Zellulose vorhanden, die durch Salzsäure ebenfalls in Dextrose übergeführt werden, so muß man die Stärke durch Erhitzen mit Wasser in geeigneten Druckapparaten (wie Lintners¹⁾ Druckflasche und Soxhlets Dampftopf) auf 130° oder mit Malzextrakt oder Diastase auf 61° in Lösung bringen, von der Zellulose usw. abfiltrieren und darauf hydrolysieren. Der im Malzextrakt enthaltene Zucker muß für sich bestimmt und in Abzug gebracht werden.

Verfahren von F. Mayrhofer.

Das von Mayrhofer²⁾ für Wurst ausgearbeitete und auch auf andere Stoffe verwendbare Verfahren besteht darin, daß man 3 bis 20 g fein zerkleinerte Substanz in einem Becherglas oder in einer tiefen Porzellanschale mit 50 ccm 8prozentiger alkoholischer Kalilauge auf dem siedenden Wasserbade bis zur Lösung erhitzt, die Lösung mit heißem 50prozentigem Alkohol verdünnt, durch ein Asbeströhrchen filtriert, den Niederschlag mit alkoholischer Kalilauge, darauf mit Alkohol wäscht, bis das ablaufende Filtrat vollständig klar ist und nicht mehr alkalisch reagiert. Das Filter samt Niederschlag wird nun in dem ursprünglichen Gefäß mit 60 ccm wässriger Normalkalilauge $\frac{1}{2}$ Stunde auf dem Wasserbade erwärmt, nach dem Erkalten mit Essigsäure angesäuert, auf 400 ccm aufgefüllt, filtriert und in einem aliquoten

¹⁾ C. J. Lintner, Zeitschr. f. angew. Chemie 1898, 725.

²⁾ F. Mayrhofer, Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- und Genußmittel 4, 1101 (1901).

Teil die Stärke durch die gleiche Menge 95prozentigen Alkohols gefällt. Die Stärke wird auf dem Filter mit 50 prozentigem Alkohol so lange gewaschen, bis eine Probe des Filtrats beim Verdampfen keinen Rückstand mehr hinterläßt, dann mit absolutem Alkohol, schließlich mit Äther, bei 50—60° C vorgetrocknet und bei 100° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Enthält die Untersuchungssubstanz auch Glykogen, so fällt es mit der Stärke aus, kann aber nach Mayrhofer in der Weise getrennt werden, indem man den Rückstand nach der Behandlung mit alkoholischer Kalilauge mit heißem 96prozentigem Alkohol durch Dekantieren auswäscht, wobei man darauf achtet, daß möglichst wenig vom Rückstande auf das Filter gelangt, das Filter mit etwa 5 Proz. Essigsäure enthaltendem 50volumprozentigem Alkohol bis auf den Rand füllt und so lange mit dem Absaugen wartet, bis das Filtrat saure Reaktion zeigt; man wäscht dann mehrmals mit 96volumprozentigem Alkohol nach und entfernt auf diese Weise das nicht auswaschbare Alkali. Nun versetzt man den Rückstand im Becherglase mit Wasser, säuert mit Essigsäure an, fällt die Stärke und das Glykogen mit einem Überschuß von 96prozentigem Alkohol und wäscht zur Entfernung des Kaliumazetats mit 96prozentigem Alkohol.

Der Rückstand im Becherglase wird mit 10 ccm 49volumprozentigem Alkohol auf dem Wasserbade auf etwa 80° C erwärmt und sofort mittels des Heißwassertrichters abgesaugt, wobei man nicht bei leerem Filter filtrieren darf, da sonst die durch den Alkohol aufgequollene Stärke die Poren des Filters verstopfen kann. Hierauf wird der Rückstand mit 10 ccm 44prozentigem Alkohol auf 80° erwärmt, wobei die Hauptmenge des Glykogens in Lösung geht und der Rest durch viermaliges Dekantieren mit 49prozentigem Alkohol entfernt wird. Die so erhaltene Stärke wird in wässriger Kalilauge gelöst, filtriert und das Filtrat in der oben angegebenen Weise weiter behandelt. Die alkoholischen Filtrate verdampft man in einem Becherglase bis zur Bildung eines Häutchens, fällt das Glykogen durch überschüssigen 96 prozentigen Alkohol aus, wäscht es mit Äther nach, trocknet und wägt.

Verfahren von G. Baumert ¹⁾.

Dieses Verfahren eignet sich für die Bestimmung der Stärke in Weizen, Roggen, Gerste, Hafer, Reis, Mais. Man versetzt in einem Becherglase 3 g der feingepulverten, mit 2—5 ccm Wasser gleichmäßig verriebenen Substanz unter Kühlung mit 10 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 und, sobald die gequollene Masse dünnflüssig geworden ist, fügt man unter fortwährendem Rühren und guter Kühlung 20prozentige Natronlauge im Überschuß hinzu, bringt den Inhalt des Becherglases in ein 200 ccm fassendes Kölbchen, füllt zur Marke, schüttelt gut durch, läßt absetzen und filtriert durch

¹⁾ G. Baumert, Zeitschr. f. Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel **18**, 167 (1909).

ein Faltenfilter. 25 ccm des Filtrats werden nach Zugabe von etwa 1 g feinflockigem Asbest unter Umrühren mit 50—60 ccm Alkohol von 94—96 Proz. gefällt, der Niederschlag durch ein geglühtes und gewogenes Asbestfilterröhrchen abgesaugt, mit Alkohol unter Zusatz von 3—5 ccm verdünnter Salzsäure, dann mit 80prozentigem und absolutem Alkohol und schließlich mit Äther ausgewaschen. Das getrocknete und gewogene Röhrchen wird im Sauerstoffstrome geglüht und nach dem Erkalten gewogen und man erfährt aus dem Gewichtsverlust die Menge Stärke.

Zur Bestimmung der Stärke in Wurst wird diese zuerst durch Behandeln mit einem Gemisch von Äther und Alkohol entfettet.

Polarimetrisches Verfahren von Elfront.

Die Stärke enthaltende Substanz wird mit Malzaufguß verzuckert, die Lösung polarisiert und so die Drehung von Dextrin und Maltose zusammen bestimmt, dann die Flüssigkeit mit Ammoniak erhitzt, mit unterchlorigsaurem Natron behandelt, Salzsäure hinzugesetzt und wieder polarisiert. Dadurch wird die Maltose zerstört, während das Dextrin unverändert bleibt, und man kann auf solche Weise nach den Resultaten der letzten Polarisation das Dextrin und aus den verschwundenen Polarisationsgraden die Maltose berechnen. Aus Dextrin und Maltose ergibt sich die Menge Stärke.

Modifikation von Lintner und Belschner¹⁾. Man verreibt 25 g der sehr fein gepulverten Substanz mit 10 ccm Wasser, 15—20 ccm konzentrierter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19, läßt $\frac{1}{2}$ Stunde stehen, spült mit Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,25 in ein 100 ccm fassendes Kölbchen, fügt 5 ccm einer 4prozentigen Natriumwolframatlösung hinzu, füllt auf 100 ccm und polarisiert. Die Polarisationsröhrchen müssen mit Hartgummiverschluß versehen sein, da sie durch Salzsäure nicht angegriffen werden. Als spezifisches Drehungsvermögen für die verschiedenen Getreidestärkearten fand Lintner im Mittel $[\alpha]_D^{20} = +202,0^\circ$. Gegen ein so hohes Drehungsvermögen fällt die Aktivität anderer Stoffe nicht ins Gewicht, wobei ein Teil derselben, die aktiven Proteine, durch Phosphorwolframsäure ausgefällt wird.

Bei Annahme des molekularen Drehungswinkels der Stärke zu $+202^\circ$ läßt sich für den beobachteten Drehungswinkel α der Gehalt C einer Lösung an Stärke nach der Formel $C = \frac{100 \times \alpha}{1 \times 202}$, also bei An-

wendung eines 200-mm-Rohres $C = \frac{100 \times \alpha}{2 \times 202} = 0,2475 \alpha$, bei einem 100-mm-Rohr $C = 0,495 \alpha$ berechnen.

Hat man z. B. 2,5 Weizenstärke in 100 ccm gelöst und im 200-mm-Rohr $+8,30' = 8,5^\circ$ gefunden, so enthalten sie $8,5 \times 0,2475 = 2,1037$ g Stärke oder 100 g Weizenstärke 84,15 g Stärke.

¹⁾ G. Belschner, Inaugural-Dissertation. München 1907.

6. Glykogen.

Quantitative Bestimmung. Man trägt in einen mit 100 ccm einer 60prozentigen Kalilauge beschickten, auf dem Wasserbade von 100°C erhitzten Kolben 100 g mit der Fleischhackmaschine zerkleinertes Organ ein, wodurch die im Organbrei stattfindende Fermentation sofort unterbrochen wird. Nach 10 Minuten wird der Kolben durchgeschüttelt, wieder in das Wasserbad gebracht und 20 Minuten nach Beginn der Erhitzung wiederholt. Nach 2 Stunden langem Erhitzen wird der Kolben unter der Wasserstrahlpumpe gleichmäßig abgekühlt und in ein Becherglas gegossen, der Kolben mit 200 ccm Wasser nachgespült, die Lösung dann mit 96prozentigem Alkohol auf 800 ccm gebracht, gut umgerührt und über Nacht stehen gelassen, wobei sich das Glykogen absetzt. In manchen Fällen tritt nicht sofort eine Fällung ein, sondern nur eine Trübung; das ist aber kein Beweis dafür, daß kein Glykogen vorhanden ist. Die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit wird in ein anderes Becherglas abgegossen und durch ein gutes Faltenfilter unter Anwendung eines mit Hahn versehenen Trichters filtriert. Der Niederschlag wird auf ein schwedisches Filter von 15 ccm Durchmesser gebracht, mit 66prozentigem Alkohol gewaschen, bis das Filtrat fast farblos abläuft, dann mit absolutem Alkohol, mit Äther und schließlich mit absolutem Alkohol wieder gewaschen. Das Faltenfilter wird mit 66prozentigem Alkohol gewaschen.

Nun wird das Filter mit dem Niederschlag über einem Becherglas entfaltet und die Masse mit einem Platinspatel in das Becherglas sorgfältig abgestrichen. Hierauf wird das Filter in den Trichter gebracht, darüber das Faltenfilter befestigt, heißes Wasser auf dieses gegossen, so daß das Filtrat das untere Filter füllt und die noch anhaftenden Glykogenreste löst, was man durch einen Pinsel befördert. Das sich jetzt im Becherglas befindliche Glykogen wird durch Umrühren in Lösung gebracht, durch Glaswolle in ein 200 ccm fassendes geeichtes Kölbchen filtriert. Die trübe, schmutzige Lösung wird nach dem Erkalten tropfenweise vorsichtig mit Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 versetzt, bis sich deutliche Flöckchen ausscheiden, die durch klare Flüssigkeit geschieden sind (man braucht gewöhnlich 0,5—1—2 ccm pro 100 g Organ, man darf weder zu viel, noch zu wenig zusetzen, weil man sonst kein klares Filtrat erhält). Ein Zusatz von einigen Kubikzentimetern Kochsalzlösung befördert die Ausscheidung der Flöckchen. Hierauf füllt man das Kölbchen bis zur Marke, gießt den Inhalt in ein Becherglas und filtriert nach dem Ausscheiden der stark gefärbten Flöckchen durch ein schwedisches oder „Blaubandfilter“ Nr. 589.

7. Zellulose.

Quantitative Bestimmung. Falls die Zellulose nicht als solche zu wägen ist, so löst man sie in konzentrierter Schwefelsäure, verdünnt mit dem zehnfachen Volumen Wasser, kocht 6 Stunden am

Rückflußkühler im Wasserbade, neutralisiert und bestimmt die entstandene Dextrose.

Zur Bestimmung der unreinen Zellulose, der sog. Rohfaser, wendet man außer dem zeitraubenden Hennebergschen (s. oben) das von Holdefleiß¹⁾ und Wattenberg, sowie das von König angegebene Verfahren an. König schlug noch ein Verfahren zur Bestimmung der Zellulose in der Rohfaser vor, der er folgende Betrachtung zugrunde legt: die Rohfaser enthält mehr Kohlenstoff als die Zellulose, und betrachtet man sie als ein Gemenge oder eine Verbindung von Zellulose mit 44,4 Proz. C und Lignin mit 55 Proz. C, so läßt sich durch Bestimmung des Kohlenstoffgehaltes die Menge der Zellulose ermitteln. Dieses Verfahren soll aber nach Kern keine einwandfreien Resultate liefern.

a) Bestimmung der Rohfaser nach Holdefleiß.

Man bringt 3 g Substanz in ein auf einer Saugflasche aufgesetztes, oben offenes, unten konisch auslaufendes birnenförmiges Gefäß, dessen untere Öffnung durch einen Asbeststopfen verschlossen ist, versetzt mit 200 ccm einer kochenden Lösung von 50 ccm 5prozentiger Schwefelsäure in 150 ccm Wasser und leitet durch das bis auf den Boden reichende Glasrohr aus dem Dampfentwickler Dampf ein, wobei die Birne mit einem Tuch umwickelt wird, um Wärmeausstrahlung zu verhindern. Nach einer halben Stunde unterbricht man die Verbindung mit dem Dampfentwickler, verbindet die Saugflasche mit der Luftpumpe und saugt die heiße Flüssigkeit ab. Das Absaugen wird zweimal mit je 200 ccm Wasser, dann mit 200 ccm einer 1,25prozentigen Kalilauge und nochmals mit Wasser wiederholt. Hierauf wird der Birnenrückstand zwei- bis dreimal mit Alkohol und Äther nachgewaschen und samt Gefäß getrocknet. Der Trockenrückstand wird in einer Platinschale bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen, dann verascht, geglüht und wieder gewogen. Die Differenz zwischen beiden Wägungen ergibt das Gewicht der aschefreien Rohfaser.

b) Bestimmung der Rohfaser nach König.

Man erhitzt 3 g lufttrockene Substanz in einem Kolben mit Rückflußkühler oder dämpft in einer Porzellanschale in einem Autoklaven bei 137° bei drei Atmosphären mit 200 ccm Glycerin vom spezifischen Gewicht 1,23, das 20 g konzentrierte Schwefelsäure im Liter enthält. Nach dem Erkalten verdünnt man den Inhalt des Kolbens oder der Schale auf 400—500 ccm, kocht nochmals auf, saugt den Niederschlag durch einen mit Asbest gepolsterten Goochtiegel ab, wäscht ihn mit etwa 400 ccm kochendem Wasser, dann mit heißem, 80—90prozen-

¹⁾ Fr. Holdefleiß, Eine abgekürzte Methode der Rohfaserbestimmung. Landwirtschaftliche Jahrbücher 1877, Suppl. 103. — Wattenberg, Eine vereinfachte Methode der Weender Rohfaserbestimmung. Journ. f. Landwirtschaft. 21, 273 (1880).

tigem Alkohol und schließlich mit einem Gemisch von Alkohol und Äther aus, bis das Filtrat farblos abläuft. Nach dem Trocknen bei 105—110° C bis zur Gewichtskonstanz verascht man und wägt wieder; die Differenz zwischen beiden Wägungen gibt die Menge aschefreier Rohfaser an.

c) Bestimmung der Zellulose, des Lignins und Cutins nach König.

Die zu untersuchende Substanz wird in derselben Weise behandelt wie bei der Rohfaserbestimmung, nur wird der Rückstand im Tiegel nicht getrocknet, sondern an der Luft verdunsten gelassen, dann in ein 800 ccm fassendes Becherglas gebracht, mit 100—150 ccm chemisch reinem 3prozentigem Wasserstoffsuperoxyd und 10 ccm 24prozentigem Ammoniak versetzt und etwa 12 Stunden mit bedecktem Uhrglase stehen gelassen. Hierauf setzt man 10 ccm 30prozentiges, chemisch reines Wasserstoffsuperoxyd zu und wiederholt so oft, bis die Rohfaser vollständig weiß geworden ist, wobei man nach dem dritten und fünften Zusatz 5—10 ccm 24prozentiges Ammoniak zugebt. Nun erwärmt man die vollständig weiß gewordene Substanz 1—2 Stunden auf dem Wasserbade, filtriert durch ein zweites Asbestfilter, wäscht den Rückstand aus und behandelt ihn samt Asbestfilter 2 Stunden auf dem Wasserbade mit 75 ccm Kupferoxydammoniak unter öfterem Umrühren und zuletzt bei sehr geringer Wärme, filtriert die Flüssigkeit dann durch einen Goochtiegel mit schwacher Asbestlage und wäscht mit etwas frischem Kupferoxydammoniak dann unter Benutzung einer anderen Saugflasche mit Wasser nach. Der bei 105—110° C getrocknete Rückstand wird gewogen, geglüht und wieder gewogen, wobei der Glühverlust die Menge des nicht oxydierbaren, in Kupferoxydammoniak unlöslichen Teiles der Rohfaser, das Cutin, angibt. Das Filtrat wird mit 300 ccm 80prozentigem Alkohol unter starkem Umrühren versetzt, wodurch sich die Zellulose in großen Flocken ausscheidet. Man bringt sie in einen Goochtiegel, wäscht sie mit verdünnter Salzsäure, trocknet, wägt und verascht. Die Differenz zwischen beiden Gewichten gibt die Menge der reinen Zellulose an, und aus der Differenz zwischen der Gesamtrohfaser und Zellulose + Cutin erfährt man die Menge des oxydierbaren Anteiles der Rohfaser, die sog. Lignine.

V. Untersuchung des Fettes.

1. Bestimmung des Wassergehaltes im Fette.

Man wägt etwa 5 g Fett in einer kleinen Glasschale zusammen mit dem Glasstabe ab und trocknet bei 100—110° unter öfterem Umrühren (da das Wasser sich am Boden des Gefäßes ansammelt und nur langsam durch das Fett hindurch verdampft) bis zur annähernden Gewichtskonstanz oder bis der Verlust in einer Stunde 1—2 mg nicht übersteigt. Bei längerem Trocknen kann ein Verlust eintreten durch

Verflüchtigung niedriger Fettsäuren, die im Fette bereits enthalten waren oder sich beim Erhitzen gebildet haben konnten, oder es kann auch infolge von Sauerstoffabsorption eine Gewichtszunahme stattfinden. Unter Umständen kann die Gewichtsabnahme infolge der Verflüchtigung und die Gewichtszunahme durch die Oxydation zu gleicher Zeit stattfinden, so daß sich beide Vorgänge das Gleichgewicht halten. Der Grad der Oxydation ist abhängig von der Größe der der Luft ausgesetzten Oberfläche, von der Temperatur und von der Dauer des Erhitzens.

Um jede Fehlerquelle beim Trocknen zu vermeiden, besonders bei trocknenden Ölen, ist es ratsam, das Erhitzen des Fettes in einem Strome von Kohlensäure, Leuchtgas oder Wasserstoff vorzunehmen. Zu diesem Zweck benutzt man ein weites Kölbchen, das mit einem doppelt durchbohrten Kork versehen ist, durch dessen eine Öffnung ein gebogenes (Zuleitungs-) Rohr bis fast an den Boden des Kolbens geht, während die andere Öffnung mit einem mit dem Kork abschneidenden, gebogenen (Ableitungs-) Rohr versehen ist. Das Zuleitungsrohr wird mit einem Chlorkalziumrohr, das Ableitungsrohr mit der Wasserstrahlpumpe verbunden und ein Gasstrom durch das auf 100° C erhitzte Fett langsam durchgesaugt.

2. Bestimmung des Gehaltes an fremden Substanzen.

10—20 g getrocknetes Fett werden in einem Kölbchen in Petroleumäther, Chloroform oder Benzol gelöst, die Lösung durch ein getrocknetes und gewogenes Filter gegossen und der Rückstand so lange mit dem Lösungsmittel gewaschen, bis eine Probe des Filtrats, auf Papier gebracht, keinen Fettfleck nach dem Verdunsten hinterläßt. Hierauf wird das Filter bei 100° getrocknet und gewogen. Wird nun das Filter samt Inhalt eingeäschert und die Asche gewogen, so ergibt die Differenz beider Wägungen die Menge organischer Substanz; die Asche gibt die Menge anorganischer Substanzen an.

Wasserlösliche Substanzen werden dem Fett durch Ausschütteln mit warmem Wasser entzogen, manche bleiben schon bei der Extraktion auf dem Filter zurück. In manchen Fällen empfiehlt es sich, das Fett in einem der gewöhnlichen Lösungsmittel zu lösen und diese Lösung mit Wasser auszuschütteln. Die in dem Waschwasser vorhandenen, von der Raffination herrührenden Mineralsäuren werden in der üblichen Weise nachgewiesen und bestimmt.

3. Bestimmung des Aschengehaltes im Fett.

Die Veraschung geschieht in der Weise, daß man 5—10 g Fett in einer Platinschale bei 100° C trocknet, dann mit einer kleinen Flamme vorsichtig erhitzt, bis das Fett in der Schale sich entzündet, wobei man die Flamme entfernt. Erlischt die Flamme, erhitzt man weiter, bis sich eine Kohle gebildet hat; darauf vergrößert man die Flamme und erhitzt weiter, bis die Kohle vollständig verschwindet und eine

weiße resp. grauweiße Masse zurückbleibt. Nach dem Erkalten wird die Masse gewogen.

4. Bestimmung des Fettgehaltes.

a) In einer Fettprobe.

Den Fettgehalt in einer Probe bestimmt man am bequemsten zugleich mit dem Gehalt an fremden Substanzen, indem man das Lösungsmittel des erhaltenen Filtrats in einem gewogenen Glas verdunsten läßt, den Rückstand trocknet und wägt. Bei Gegenwart von schleimigen oder stärkemehlhaltigen Substanzen empfiehlt es sich, das Fett mit der vier- bis fünffachen Menge gebranntem Gips oder besser geglühtem Seesand zu verreiben, bei 100° unter öfterem Umrühren zu trocknen und hierauf in einem für diese Zwecke konstruierten Apparate zu extrahieren. Gebrannter Gips eignet sich nicht zur Fettbestimmung, da er, wie Gebek¹⁾ festgestellt hat, manche Bestandteile zurückhält und seine Wirkung keine gleichmäßige ist. Obwohl die Knochenkohle ein vollständig harzfreies, farbloses und sehr reines Fett liefert, kann sie doch bei Fettbestimmungen nicht empfohlen werden, weil ein Teil freier Fettsäuren zurückbehalten wird. Dagegen liefert die zur Weinklärung gebrauchte spanische Erde ein ziemlich reines, farbloses und klares Fett, ohne von den Bestandteilen des Fettes etwas zurückzuhalten.

Von den Apparaten hat sich der von Soxhlet (Fig. 6 und 7) am vortrefflichsten bewährt. Die zu extrahierende Substanz kommt in eine Hülse aus entfettetem Filtrierpapier; die Hülse darf nicht fest und ganz angefüllt werden; um zu verhüten, daß kleine Teilchen der Substanz weggeschlämmt werden, legt man noch etwas Baumwolle auf. Das Rohr B wird mittels eines Korkes mit einem Kölbchen von 100 bis 150 ccm Inhalt verbunden, dann bringt man in den Extraktionszylinder die Hülse mit der Substanz und so viel von dem Extraktionsmittel, bis es durch den Heber abfließt, fügt einen kleinen Überschuß zu, verbindet A mit einem Kühler und erwärmt das Kölbchen auf dem Wasserbade, bis die Substanz vollständig erschöpft ist. Die Dämpfe des im Kölbchen befindlichen Lösungsmittels steigen durch B und C nach A und von hier in den Kühler, in dem sie sich kondensieren und im flüssigen Zustande auf die Substanz herab-

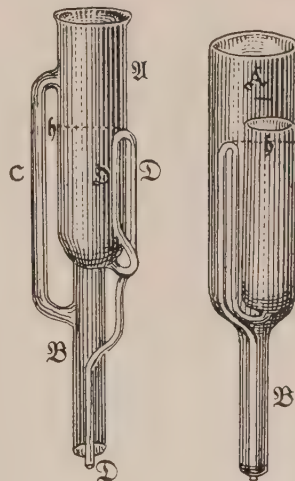


Fig. 6 und 7.
Extraktionsapparat von Soxhlet.

¹⁾ Gebek, Fettextraktionen. Landwirtschaftl. Versuchsstation 43, 193 (1894).

tropfen. Wenn die Flüssigkeit in *A* sich so weit ansammelt, daß sie den Rand *h* erreicht, so läuft sie von selbst durch den Heber *D* ab. Die Flüssigkeit im Kölbchen verdampft wieder, kondensiert sich und dient auf solche Weise zur weiteren Extraktion — dieser Vorgang wiederholt sich so oft, daß *A* in einer Stunde etwa 20mal entleert wird. Ist die Extraktion beendet, so destilliert man den Inhalt des Kölbchens auf dem Wasserbade ab, trocknet den Rückstand einige Stunden bei 100° und wägt.

Lewkowitsch¹⁾ bringt an dem Heberrohre einen Hahn an, der dazu dient, um zu jeder Zeit eine Probe entnehmen und auf den Fettgehalt prüfen zu können.

b) In tierischem und pflanzlichem Material.

Um den Fettgehalt im tierischen und pflanzlichen Material zu bestimmen, wird dasselbe zuerst getrocknet, dann möglichst fein zerkleinert resp. pulverisiert und mit Äther, Petroläther, Alkohol, Chloroform oder ähnlichen Lösungsmitteln extrahiert. Die Substanz wird gewöhnlich im Trockenschrank bei 100° getrocknet. Um jedoch eine mögliche Veränderung des Fettes zu vermeiden, ist es ratsam, die Substanz bei gewöhnlicher Temperatur oder bei 40—50° im Vakuum über Schwefelsäure zu trocknen. Das Trocknen nach N. Zuntz und Hagemann erfolgt bei niedriger Temperatur im Vakuum über Schwefelsäure im Leuchtgasstrome, wobei das Gas zuerst mit Schwefelsäure gewaschen, durch Kalilauge und Kalistücken durchgeleitet wird.

Da fettreiches Material sich schwer oder gar nicht pulverisieren läßt, so empfiehlt es sich, dasselbe mit kaltem Äther oder Alkohol in einer dickwandigen Flasche zu übergießen und unter öfterem Umschütteln 24 Stunden stehen zu lassen. Der Äther resp. Alkohol wird dann abfiltriert, verdunstet, der Rückstand mit Petroläther aufgenommen und nach dem Verdunsten und Trocknen gewogen. Die kalt extrahierte Substanz wird nun in der üblichen Weise getrocknet, fein zerrieben und ein aliquoter Teil mit einem der genannten Lösungsmittel im Soxhletapparat bis zur Erschöpfung extrahiert.

Pflüger²⁾ hat zuerst die Beobachtung gemacht, daß es nicht gelingt, eine vollständige Erschöpfung der Substanz an Fett durch Ätherextraktion zu erreichen und erklärt diese Erscheinung durch das langsame Eindringen des Äthers in die Substanz. Argutinsky erhielt nach wochenlangem Stehenlassen der Substanz in kaltem Äther durch darauffolgendes Extrahieren im Soxhletschen Apparat noch bedeutende Extraktmengen, und nach achttägigem Extrahieren war die Substanz noch nicht vollständig entfettet. Auch Dormeyer erhielt nach monatelangem Extrahieren im Soxhletschen Apparat in den folgenden 38 Stunden noch 0,5 Proz. der gesamten Extraktmenge.

Pflüger kam zuerst auf den Gedanken, das Gewebe durch Erwärmen auf dem Wasserbade in einer 5—20prozentigen Zitronen-

¹⁾ Lewkowitsch, Journ. Chem. Soc. 1889, 360.

²⁾ E. Pflüger, Über die Entstehung von Fett aus Eiweiß im Körper der Tiere. Pflügers Archiv 51.

säurelösung aufzulösen und auf solche Weise das gesamte Fett zu gewinnen.

Die von Dormeyer¹⁾ vorgeschlagene Verdauungsmethode besteht auch im wesentlichen in einer Erschließung der Substanz; er verfährt in folgender Weise. Fein pulverisierte, im Vakuum getrocknete Substanz wird 4—6 Stunden im Soxhletapparat mit Äther extrahiert, um die Hauptmenge des Fettes aus der Substanz zu entfernen. Aus der mit Äther extrahierten, aufs feinste pulverisierten und durchgemischten Substanz werden 2—4 g entnommen, mit 100 ccm der Verdauungsflüssigkeit verrührt und im Brutofen stehen gelassen. Die Verdauungsflüssigkeit wird aus Schweine- oder Hundemägen mit 0,5prozentiger Salzsäure oder aus käuflichem Pepsin mit Salzsäure (0,1 Proz. Pepsin, 0,5 Proz. Salzsäure) hergestellt. Die Dauer der Einwirkung ist bei Anwendung eines Magenschleimhautauszuges $\frac{3}{4}$ bis 2 Stunden, dagegen bei einem Pepsinpräparat 10—24 Stunden. Da ein Teil der Substanz unverdaut bleibt, so muß man die Flüssigkeit filtrieren, den Rückstand im Exsikkator trocknen und dann im Soxhletapparat mit Äther ca. 40 Stunden extrahieren. Die von der Verdauung erhaltene Flüssigkeit wird mehreremal mit Äther ausgeschüttelt. Die so erhaltenen Auszüge werden nach dem Verdunsten des Äthers getrocknet und gewogen.

Die Herstellung der Verdauungsflüssigkeit wird nach Voit²⁾ auf folgende Weise ausgeführt: Die Schleimhaut von drei Schweinemägen wird fein zerwięgt, mit 3 Liter 0,4prozentiger Salzsäure 2 Tage stehen gelassen, dann koliert und filtriert. Zu der Flüssigkeit werden 6 ccm Chloroform hinzugefügt, um dieselbe längere Zeit unverändert aufbewahren zu können. Auf 4 g Substanz werden 300 ccm dieser Verdauungsflüssigkeit mit 300 ccm Wasser gebraucht, die Verdauung dauert 48 Stunden im Brutofen. Der Ätherextrakt wird durch Lösen in Petroläther gereinigt.

Schlesinger³⁾ verfährt in der Weise, daß er geringe Mengen Substanz, ca. 1 g, anwendet, mit Äther extrahiert, der künstlichen Verdauung in 300 ccm Flüssigkeit im Brutofen bei 37—38° unterwirft und die Flüssigkeit dann nach der Dietrichschen oder Adam-schen Methode behandelt.

Nerking⁴⁾ unterwirft die künstlich verdaute Substanz der Behandlung im Perkulator.

Der Methode von Liebermann und Szekely⁵⁾ liegt dasselbe Prinzip zugrunde — die Erschließung der Substanz, mit

¹⁾ Dormeyer, Die quantitative Bestimmung von Fetten, Seifen und Fettsäuren in tierischen Organen. Pflügers Archiv 65, 90 (1896).

²⁾ E. Voit, Ein Beitrag zur Methode der Fettbestimmung. Zeitschr. für Biol. 35, 555.

³⁾ Schlesinger, Zur Kritik der Fettbestimmungen. Dissertation.

⁴⁾ J. Nerking, Neue Beiträge zur Fettbestimmung in tierischen Geweben und Flüssigkeiten. Pflüg. Arch. 73, 172 (1898).

⁵⁾ Liebermann und Szekely, Eine neue Methode der Fettbestimmung in Futtermitteln, Fleisch, Kot usw. Pflüg. Arch. 72, 360.

dem Unterschiede, daß hier das Fett durch Kalilauge frei gemacht wird.

5 g Substanz werden mit 30 ccm 50prozentiger Kalilauge (spezifisches Gewicht 1,54) eine halbe Stunde auf dem Asbestdrahtnetz in einem Kolben (Fig. 8) gekocht. Nach dem Abkühlen fügt man 30 ccm Alkohol hinzu und nach 10 Minuten langem Kochen versetzt man das abgekühlte Gemenge mit 100 ccm 20prozentiger Schwefelsäure, wobei die Flüssigkeit abgekühlt wird. Die völlig erkaltete Flüssigkeit wird mit 50 ccm Petroleumäther ausgeschüttelt und unter Umschütteln in Intervallen von 1—2 Minuten eine Stunde stehen gelassen. Nach Zusatz einer gesättigten Kochsalzlösung bis zur Marke



Fig. 8.

240 ccm werden 20 ccm von der Petroleumätherschicht abpipettiert, mit 40 ccm säurefreiem 96prozentigem Alkohol und 1 ccm Phenolphthalein versetzt und mit $n/_{10}$ alkoholischer Kalilauge titriert. Die Seifen werden nach dem Verdunsten des Petroleumäthers und Alkohols getrocknet und gewogen. Aus der verbrauchten Menge Kalilauge, dem Gewicht der Seifen und der angewandten Substanz wird mittels der zu diesem Zwecke aufgestellten Formel der Fettgehalt in Prozenten berechnet.

$$F = \left[\frac{S - 0,01 - (K \times 0,00255)}{a} \right] \cdot 250.$$

F = Fettgehalt der Substanz in Prozenten.

S = Gewicht des fettsauren Kali in 20 ccm Petroläther.

K = die zur Titrierung von 20 ccm Petrolätherlösung verbrauchten Kubikzentimeter $n/_{10}$ Kalilauge.

a = Gewicht der angewandten Substanz.

Die von Kumagawa und Suto ¹⁾ empfohlene Modifikation besteht im folgenden. 2—5 g Substanz werden in einem Becherglas mit 25 ccm Natronlauge (20 g NaOH in 100 ccm) auf dem Wasserbade 2 Stunden gekocht; das Becherglas wird mit einer Glasglocke bedeckt. Während der Verseifung wird die Mischung ein paarmal mit dem Glasstabe umgerührt. Nach zweistündigem Kochen wird die Lösung noch heiß in einem hermetisch schließenden Scheidetrichter quantitativ übergespült, die Mischung nach dem Abkühlen auf 40 bis 50° mit 30 ccm 20prozentiger Salzsäure (1,1) versetzt. Nach dem Erkalten werden 70—100 ccm Äthyläther hinzugegeben und gut durchgeschüttelt, wobei sich ein Niederschlag zu einer dünnen Schicht in der Mitte verdichtet; die klare wässrige Schicht wird nach einigen Minuten abgegossen, während der bräunlich gefärbte Äther in ein Becherglas umgegossen wird. Der Trichter mit Niederschlag wird zweimal mit ein wenig Äther ausgespült. Hierauf wird der Nieder-

¹⁾ Kumagawa und Suto. Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Fettes. Biochem. Zeitschr. 8, 212 (1908).

schlag in 5 ccm Natronlauge nochmals gelöst, die alkalische Lösung von neuem mit 30—50 ccm Äther gut geschüttelt, die stark saure wässrige Lösung der ersten Schüttelung hinzugefügt und nochmals geschüttelt. Die Reaktion wird sauer und die restierende Fettsäure geht quantitativ in den Äther über. Der vereinigte Äther wird verdunstet, nochmals mit absolutem Äther aufgenommen, durch Asbest filtriert und verdunstet. Dieser Extrakt wird erst dann mit Petroleumäther aufgenommen und nach dem Filtrieren und Verdunsten des Petroläthers bei 50° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Bogdanow¹⁾ konstatierte zuerst, daß man durch Kochen mit Alkohol viel mehr ätherlösliche Substanzen gewinnen kann, als durch das gewöhnliche Extrahieren mit Äther allein. Die Substanz wird von der Hauptmenge des Fettes durch mehrtägiges Stehen in Äther befreit, der Äther abgegossen, der Rückstand getrocknet und fein pulverisiert und 3 Tage mit 90prozentigem Alkohol gekocht oder im Soxhletschen Apparat extrahiert. Der Extrakt wird nach dem Verjagen des Alkohols durch Auflösen in kaltem Äther gereinigt.

Frank²⁾ läßt 20 g fein gewiegtes Fleisch in 96 prozentigem Alkohol unter öfterem Umschütteln stehen; nach 24 Stunden wird die Flüssigkeit dekantiert und diese Manipulation dreimal mit absolutem Alkohol und zweimal mit Äther wiederholt. Der Rückstand wird auf dem Wasserbade vom Äther befreit, fein pulverisiert und im Soxhletschen Apparat 24 Stunden mit Äther extrahiert. Sämtliche Auszüge werden am besten im Vakuum abdestilliert, der so erhaltene, bei 100° getrocknete Extrakt in wasserfreiem Äther oder Petroläther gelöst, filtriert, der Äther verdunstet und der Rückstand gewogen.

Man erhält auf solche Weise um 10 Proz. Extrakt mehr, auf die Gesamtmenge Fett bezogen, als durch unmittelbare längere Ätherextraktion.

Nach Voit³⁾ verfährt man in der Weise, daß man die Substanz zuerst mit soviel Alkohol zusammenrührt, bis die Masse krümelig wird, läßt auf dem Wasserbade unter 80° so lange stehen, bis aller Geruch nach Alkohol verschwunden und die Masse pulverisierbar geworden ist, was ungefähr 15 Stunden dauert. Zur Extraktion werden etwa 4 g der lufttrockenen Substanz zuerst bei 78° C 12 Stunden getrocknet, dann in Papierhülsen (Patronen) gebracht und im Soxhletapparat 24 Stunden mit Äther extrahiert. Der nach dem Verdunsten des Äthers erhaltene Extrakt wird durch Aufnehmen in Petroläther vom Siedepunkt 30°—40° gereinigt.

¹⁾ E. Bogdanow, Neue Methode der Fettbestimmung in tierischen Substanzen. Pflüg. Arch. 68, 431 (1897).

²⁾ Otto Frank, Eine neue Methode, Fleisch von Fett zu befreien. Zeitschr. für Biol. 35, 549.

³⁾ E. Voit, Ein Beitrag zur Methode der Fettbestimmung. Zeitschr. für Biol. 35, 555.

Noël Paton¹⁾ übergießt die zerkleinerte Leber mit Alkohol, läßt eine Woche stehen, zerreibt die Substanz im Mörser mit Alkohol, dampft das Ganze auf dem Wasserbade bei ca. 80° ein und extrahiert mit Äther 12 Stunden im Soxhletapparat. Bei Wiederholung dieser Manipulation erhielt er noch 0,4 Proz. der gesamten Fettmenge.

Schlesinger und Rosenfeld²⁾ wenden als Extraktionsmittel Chloroform an. Rosenfeld verfährt derart, daß er 20 g Substanz in der Patrone zusammengebunden in absolutem Alkohol auf dem Wasserbade $\frac{1}{2}$ Stunde auskocht, die Patrone dann in den Soxhletapparat setzt und 6 Stunden mit Chloroform extrahiert. Diese Manipulationen werden einmal wiederholt. Der Alkohol- und Chloroformauszug werden eingedampft, der Rückstand mit absolutem Äther oder Petroläther aufgenommen, filtriert und nach Verjagen des Äthers gewogen.

Nach dieser Methode erhält man die höchste Prozentzahl Extrakt und trotzdem liefert auch die nach dieser Methode entfettete Substanz durch die darauffolgende Verdauung nicht zu vernachlässigende Mengen Extrakt. Rosenfeld erhielt sogar nach 35 stündigem Extrahieren mit Chloroform und abwechselnder Auskochung in Alkohol durch die darauffolgende Verdauung noch 0,23 Proz. Extrakt.

Das von Glikin³⁾ angegebene Verfahren geht dahin, das durch die Extraktion erhaltene Fett von seinem beständigen Begleiter, dem Lecithin, sowie von den stickstoffhaltigen Substanzen möglichst zu befreien. Zu diesem Zwecke wird die Substanz bei 60—65° im Vakuum getrocknet, mit der zwischen 50 und 60° siedenden Fraktion Petroläther extrahiert, der Rückstand nach dem Verdunsten des Petroläthers in Azeton gelöst, oder in Chloroform gelöst und mit Azeton gefällt. Nach dem Filtrieren und Verdunsten des Lösungsmittels bleibt ein nahezu lecithinfreies Fett mit einem sehr geringen Stickstoffgehalt zurück.

5. Bestimmung des Schmelz- und Erstarrungspunktes.

a) Schmelzpunkt.

Da die Fette nach dem Schmelzen nur sehr langsam, in 2—3 Tagen, ihre normale Konsistenz resp. den normalen Schmelzpunkt wieder erhalten, so ist es notwendig, gleichgültig, welche Methode angewendet werden soll, die vorbereiteten Proben 2 bis

¹⁾ N. Paton, Über die Beziehung der Leber zu den Fetten. *Maly* **26**, 45 (1896).

²⁾ Schlesinger, Zur Kritik der Fettbestimmung. Dissertation. — Rosenfeld, *Zentralbl. f. innere Medizin* **33**.

³⁾ W. Glikin, Untersuchungen zur Methode der Fettbestimmung im tierischen Material. *Pflügers Archiv* **95** (1903).

3 Tage bei gewöhnlicher Temperatur resp. auf Eis stehen zu lassen, damit das Fett bis zu seinem normalen Schmelzpunkt erstarren kann. Ferner muß die zu untersuchende Fettprobe möglichst wasserfrei sein, da der Wassergehalt den Schmelzpunkt meist etwas erhöht.

Die von Pohl¹⁾ angegebene Methode der Schmelzpunktbestimmung resp. Tropfpunktbestimmung besteht in der Ermittlung derjenigen Temperatur, bei der das Fett flüssig wird, wobei es noch feste Partikelchen enthalten kann. Man taucht die Thermometerkugel in das geschmolzene Fett mehrmals nacheinander ein, so daß nach dem Herausnehmen und Erkalten die Quecksilberkugel mit einer etwa 2 mm dicken Schicht Fett überzogen ist. Nachdem das Fett vollkommen erstarrt ist, befestigt man das Thermometer mittels Kork in einem weiten Reagensrohre, so daß die Quecksilberkugel noch wenigstens 1 cm von dem Boden desselben entfernt ist, spannt das Rohr mit einer Klammer 2 bis 3 cm über ein Schutzblech oder eine Asbestplatte, die sehr langsam erwärmt wird und beobachtet die Temperatur, bei der sich am unteren Ende der Kugel ein Tropfen des geschmolzenen Fettes zeigt.

Das Verfahren von Pohl gestattet nicht die Ermittlung des wahren Tropfpunktes, weil es nicht möglich ist, das Fett in immer gleich dicker Schicht auf die Thermometerkugel aufzutragen und daher das Abgleiten des Tropfens von der verschiedenen Menge oder verschiedenem Gewicht der Substanz abhängig ist. Der Begriff des wahren Tropfpunktes wurde zuerst von Ubbelohde²⁾ eingeführt; darunter ist der Wärme-grad zu verstehen, bei dem ein Tropfen unter seinem eigenen Gewicht von einer gleichmäßig erwärmten Masse des tropfenbildenden Stoffes abfällt, deren Menge oder Gewicht den Tropfen nicht beeinflußt. Der dazu dienende Apparat besteht aus einem Einschlußthermometer *a*, das mit der zylindrischen Metallhülse *b* fest verbunden ist; diese besitzt bei *c* eine kleine Öffnung. Der unten federnde Teil der Hülse trägt die zylindrische, oben glatt geschliffene Glashülse *i*. Letztere ist 10 mm lang, 7 mm breit und hat eine untere Öffnung von 3 mm Weite. Zur Benutzung des Apparates wird das abgenommene Glasgefäß *e* mit dem zu untersuchenden Stoff durch Hineindrücken oder Hineinstreichen desselben gefüllt.

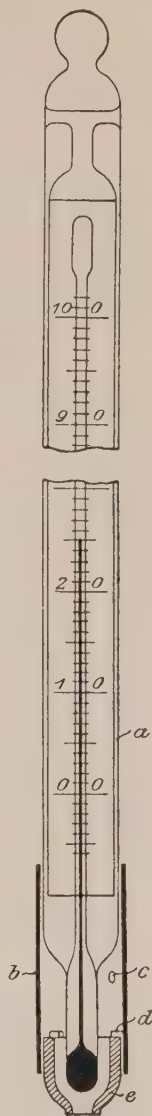


Fig. 9.
Apparat zur Bestimmung des Tropfpunktes nach Ubbelohde.

¹⁾ Pohl, Bericht der Akademie. Wien 6, 587.

²⁾ L. Ubbelohde, Der wahre Tropfpunkt und ein Apparat zu seiner Bestimmung. Zeitschr. f. angew. Chem. 18, 1220 (1905).

Die überschüssige Menge wird unten und oben glatt abgestrichen und der Apparat parallel seiner Achse eingeführt. Ist der Stoff so fest, daß beim Zusammenstecken der Apparat zusammenbrechen könnte, so wird der geschmolzene Stoff mittels einer dazu konstruierten Pipette in das mit seiner kleinen Öffnung auf eine Glasplatte oder Tischplatte gestellte Gefäß eingefüllt und, noch ehe der Stoff völlig erstarrt ist, von oben her der Apparat aufgesteckt. Nun wird der Apparat in einem etwa 4 cm weiten Reagenzrohre durch einen Kork befestigt und im Wasserbade so erhitzt, daß der Temperaturanstieg in der Minute 1° beträgt. Kurz bevor der erste Tropfen abfällt, beginnt der erweichende Stoff in Form einer gewölbten Fläche aus der unteren Öffnung her auszutreten. Dieser gut zu beobachtende Punkt ist als Beginn des Fließens zu notieren. Die Geschwindigkeit des Heraustretens der Masse nimmt mit steigender Erhitzung zu, bis der Tropfen abfällt — dieser Punkt ist als Tropfpunkt anzugeben.

Am häufigsten wird die Schmelzpunktbestimmung in dünnwandigen, nicht zu engen Kapillarröhrchen von etwa 3 mm im Durchmesser ausgeführt, die man sich leicht selbst verfertigen kann, indem man ein an einem Ende verschlossenes dickwandiges Glasrohr über der Gebläseflamme erweicht und während des Ausziehens am anderen offenen Ende schwach anbläst. Man bestimmt im offenen oder im

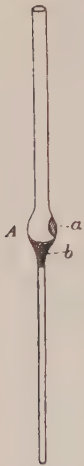


Fig. 10.
Apparat
zur Be-
stimmung
des
Schmelz-
punktes
nach
Bense-
mann.

geschlossenen Röhrchen, je nach dem man das Flüssigwerden oder das Durchsichtigwerden der Fette als Schmelzpunkt annimmt. Man füllt offene resp. an einer Seite zugeschmolzene Röhrchen durch Aufsaugen mit dem geschmolzenen Fett und läßt erkalten. Das so vorbereitete Röhrchen befestigt man mittels eines Gummiringes am Thermometer, so daß die Fettsäule sich in gleicher Höhe mit dem Quecksilbergefaße befindet, bringt hierauf das Thermometer in ein mit kaltem Wasser gefülltes Becherglas, erwärmt sehr langsam und notiert die Temperatur in dem Augenblicke, in dem das Wasser das geschmolzene Fett aus der Röhre in die Höhe treibt resp. in dem das geschmolzene Fett durchsichtig wird.

Bensemanns ¹⁾ Methode besteht darin, daß man den Anfangs- und Endpunkt des Schmelzens feststellt. Bensemann verfährt in folgender Weise: In ein auf der Hälfte seiner Länge verjüngtes, bei A ein wenig aufgeblasenes Glasrohr, das an dem engen Ende zusammengeschmolzen ist, werden 2—3 Tropfen Fett gebracht und durch Neigen unmittelbar über der Verengungsstelle gesammelt und erstarren gelassen (a). Hierauf wird das Röhrchen in üblicher Weise am Thermometer befestigt und das Ganze in ein Becherglas mit kaltem Wasser gebracht, mit einer kleinen Flamme langsam erhitzt, bis

¹⁾ Bensemann, Repertorium d. analytischen Chemie 11, 165 (1885).

der weich gewordene Fetttropfen herabzufließen beginnt. Die Temperatur, bei der dies stattfindet, wird als „Anfangspunkt des Schmelzens“ bezeichnet. Der herabfließende, noch trübe Tropfen gelangt in die Lage *b* und wird dann bei weiterem Erwärmen vollständig durchsichtig; die Temperatur, bei der dies stattfindet, wird als „Endpunkt des Schmelzens“ betrachtet.

b) Erstarrungspunkt.

Unter Erstarrungspunkt versteht man diejenige Temperatur, bei der ein flüssiges resp. geschmolzenes Fett in den festen Zustand übergeht. Zur Ermittlung des Erstarrungspunktes bringt man eine 2 bis 3 cm hohe Schicht des geschmolzenen Fettes in ein dünnes Proberröhrchen oder Kölbchen und hängt in dasselbe mittels eines Korkes ein Thermometer so ein, daß die Kugel desselben ganz von dem flüssigen Fett bedeckt ist. Hierauf hängt man das Röhrchen oder Kölbchen in ein mit warmem Wasser von 40 bis 50° gefülltes Becherglas und läßt erkalten. Die Quecksilbersäule sinkt bis zu einem bestimmten Punkt und bleibt eine Zeitlang konstant, um dann weiter zu sinken. Das Fett erstarrt während des Konstantbleibens und die dabei herrschende Temperatur ist der Erstarrungspunkt. Mitunter findet man bis zum Anfange des Erstarrens ein Sinken der Temperatur und dann während des vollständigen Erstarrens wieder ein Steigen. Man betrachtet in diesem Falle die höchste Temperatur während des Erstarrens als die Erstarrungstemperatur (Margarinegesetz).

Die Bestimmung des Erstarrungspunktes geschieht nach Finkener in der Weise, daß man 150 g der Durchschnittsprobe des zu untersuchenden Fettes in einer unbedeckten Porzellanschale auf dem siedenden Wasserbade zum Schmelzen erhitzt, nach dem Schmelzen noch $\frac{1}{2}$ Stunde auf dem siedenden Wasserbade stehen läßt und das Fett in das Kölbchen bis zur Marke einfüllt (Fig. 11). Das Kölbchen stellt man sofort in den Kasten, klappt den Deckel desselben zu, nachdem das Thermometer eingesetzt ist und, sobald die Temperatur auf etwa 50° gesunken ist, beginnt man den Stand des Thermometers in Zwischenräumen von 2 Minuten abzulesen und zu notieren.

Bei harten Fetten fängt das Thermometer nach einiger Zeit an, langsamer zu fallen, bleibt einige Minuten stehen, steigt wieder, erreicht einen höchsten Punkt und beginnt dann wieder zu fallen. Dieser höchste Stand ist der Erstarrungspunkt.

Bei weichen Fetten fängt das Thermometer nach einiger Zeit an, langsamer zu fallen, bleibt einige Minuten auf einem Punkte stehen

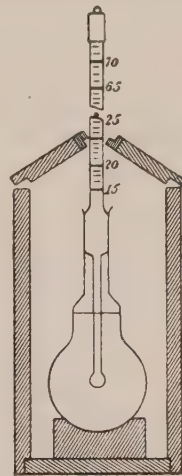


Fig. 11.
Apparat zur Bestimmung des Erstarrungsprozesses nach Finkener.

und sinkt dann, ohne den vorigen dauernden Stand wieder zu erreichen. Der beobachtete höchste, sich auf einige Zeit nicht ändernde Stand gibt den Erstarrungspunkt an.

Den Erstarrungspunkt der Fettsäuren ermittelt Finkener ¹⁾ in folgender Weise. 100 g des zu prüfenden Fettes werden in einem mit einem Uhrglas bedeckten, etwa 1.5 Liter fassenden Becherglase mit 30 ccm Kalihydrat, 100 ccm absolutem Alkohol und 40 ccm Wasser $\frac{3}{4}$ Stunden lang auf einem siedenden Wasserbade erwärmt und mit einem Liter kochenden Wasser versetzt. Das so erhaltene Seifengemisch wird in 200 ccm heiße verdünnte Schwefelsäure (1 : 4) unter Umrühren in einem dünnen Strahle gegossen, das Ganze durchgerührt und auf dem Wasserbade bis zur klaren Abscheidung der Fettsäure erhitzt. Die unter den flüssigen Fettsäuren befindliche schwach getrübe Lösung entfernt man mittels eines mit Glashahn versehenen Hebers. Hierauf prüft man eine herausgenommene Probe der abgeschiedenen Fettsäuren auf ihre Löslichkeit in alkoholischem Ammoniak; ist die Lösung nicht klar, muß die Verseifung wiederholt werden. Die Fettsäuren werden mit 1 $\frac{1}{2}$ Liter heißem Wasser gewaschen und nach Entfernung der wässerigen Flüssigkeit mittels des Hebers noch warm in den Kolben des Apparates bis zur Marke eingefüllt und die Bestimmung in der oben angegebenen Weise ausgeführt.

In Frankreich, England und Amerika wird die Bestimmung des Erstarrungspunktes der Fettsäuren nach der von Dalcian angegebenen Methode ausgeführt, die unter dem Namen „Titertest“ bekannt ist.

Man verseift 100 g Fett, scheidet die Fettsäuren durch Erwärmen mit verdünnter Schwefelsäure, kocht wiederholt mit Wasser aus, trocknet sie nach dem Erstarren mit Filtrierpapier ab, schmilzt und filtriert durch ein trockenes Faltenfilter in eine Porzellanschale, die man über Nacht im Exikkator stehen läßt. Die Fettsäuren werden dann vorsichtig geschmolzen und ein 16 cm langes und 3.5 cm weites Reagenzrohr bis zu $\frac{2}{3}$ damit gefüllt. Das Reagenzglas wird in dem Halse einer 2 Liter-Flasche mittels eines Korkes befestigt und ein in $\frac{1}{10}$ Grade geteiltes Thermometer so in die Fettsäuren eingesenkt, daß die Quecksilberkugel sich in der Mitte der Fettmasse befindet. Sobald am Boden des Gefäßes sich Kristalle abzuschcheiden beginnen, rührt man die Masse mit dem Thermometer gleichmäßig nach links und nach rechts um, wobei die Masse undurchsichtig wird. Währenddessen beobachtet man genau den Stand des Thermometers und notiert die Temperatur in kurzen Zwischenräumen. Sie sinkt zuerst, steigt dann rasch bis zu einem Maximum, bleibt eine zeitlang konstant und fällt dann wieder. Das Temperaturmaximum ist der Erstarrungspunkt oder Titer.

¹⁾ Finkener, Mitteilungen der kgl. Versuchsanstalt Berlin 1889, 24; 1890, 153. — Chemiker-Zeitung 1890, 132.

6. Spezifisches Gewicht.

Bei der Bestimmung des spezifischen Gewichtes der Öle ist auf die Temperatur besonders zu achten, da die Öle bei steigender Temperatur ein höheres Ausdehnungsvermögen haben als die meisten anderen Flüssigkeiten. Es vermehren sich z. B. 1000 Liter Olivenöl bei 0° C gemessen, auf 1016,6 Liter bei 20° gemessen. Im allgemeinen genügt es vollkommen, die Korrektur $\pm 0,0007$ für je 1° Temperaturunterschied anzubringen. Bei sehr genauen Bestimmungen ist der kubische Ausdehnungskoeffizient des Glases = 0,000025 und die entsprechende Tabelle zu berücksichtigen.

Einen Einfluß auf das spezifische Gewicht der Fette und Öle übt auch die Gegenwart freier Fettsäuren in der Weise aus, daß mit dem zunehmenden Gehalt der Fettsäuren das spezifische Gewicht des Fettes steigt, ohne daß es aber bis jetzt gelungen ist, eine bestimmte Beziehung zwischen spezifischem Gewicht und dem Prozentgehalt freier Fettsäuren festzustellen.

Von den vielen zur Bestimmung des spezifischen Gewichtes vorgeschlagenen Apparaten sollen hier nur die wichtigsten besprochen werden.

Bestimmung mit dem Pyknometer.

Das Pyknometer ist ein Glasfläschchen von bestimmtem Rauminhalt. Die einfachste Form ist ein Fläschchen *A* mit einem durchbohrten, eingeschliffenen Glasstöpsel *B*, an dem eine Marke *m* angebracht ist. Man füllt *A* mit Wasser bis zum Rande, so daß es als Kuppe übersteht, setzt den Stöpsel auf und tupft das ausgespritzte Wasser bis zur Marke *m* mit Filtrierpapier ab. Nachdem das Pyknometer in einem Wasserbade von 15° C gestanden hat, wird es sorgfältig von außen abgetrocknet und gewogen. Nun füllt man das getrocknete Pyknometer mit dem zu untersuchenden Öl und wägt wieder. Da die gewogenen Volumina von Wasser und dem Öl gleich waren, so braucht man nur das Gewicht des letzteren durch das des Wassers zu dividieren, um das spezifische Gewicht des Öles zu erhalten.



Fig. 12.
Pyknometer.

Vollkommener ist das Pyknometer mit Steigrohr und Thermometer (Fig. 13). In das Fläschchen *A* ist ein Thermometer eingeschliffen. *C* ist ein sich oben etwas erweiterndes, enges Rohr, das nahe seinem oberen Ende eine Marke *m* trägt und das durch einen kleinen eingeschliffenen Stöpsel verschlossen ist. Man füllt dasselbe bei geöffnetem Stöpsel bis zum Rande von *h*, setzt das Thermometer ein, entfernt mit etwas Filtrierpapier die Flüssigkeit bis zur Marke *m* und setzt schließlich den kleinen Stöpsel in *C* ein.

Dieses Pyknometer ist etwas unbequem, wenn die Temperatur des Wägezimmers höher ist als die Bestimmungstemperatur.

Eine sehr große Genauigkeit erreicht man mit dem von Sprengel¹⁾ angegebenen Pyknometer (Fig. 14, 15). Eine U-Röhre ist an beiden Enden ausgezogen, die engen Teile sind horizontal umgebogen, wobei der Teil *a* kürzer und enger ist als *b*; der längere Teil *b* ist mit einer Marke

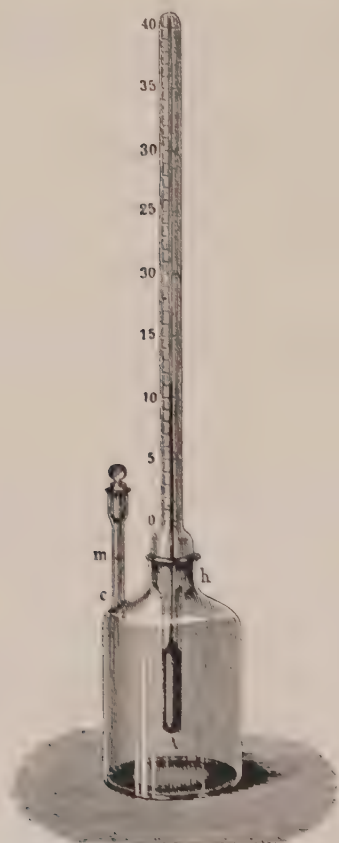


Fig. 13.
Pyknometer mit Steigrohr und
Thermometer.



Fig. 14 und Fig. 15.
Sprengels Pyknometer.

versehen. Man füllt den Apparat, indem man *b* in das Öl oder geschmolzene Fett eintaucht und bei *a* dieselbe unter Einschaltung eines Kugelhohres durch einen Kautschuk Schlauch ansaugt. Nun bringt man das Pyknometer in ein Wasserbad von konstanter Temperatur. Wenn sich das Fett nicht weiter ausdehnt, tupft man bei *b* solange mit Filtrierpapier ab, bis es in *b* genau die Marke *m* erreicht. Ist zu viel Fett fortgenommen, so nähert man *a* einem Glasstab, an dem ein Tropfen des Fettes hängt, der vermöge der Kapillarkraft angesaugt wird.

¹⁾ Sprengel, Zeitschr. f. analytische Chemie 13, 162 (1874).

Zweckmäßig nimmt man das Bad etwas wärmer als die umgebende Luft, dann zieht sich nach dem Herausnehmen aus dem Bade das Fett in das Pyknometer zurück, während es im entgegengesetzten Falle leicht ausfließt.

Fig. 16 stellt eine Modifikation der ursprünglichen Form dar.

Der Bestimmung des spezifischen Gewichtes fester Fette und Wachse setzen sich manche Schwierigkeiten in den Weg, die man dadurch zu beseitigen versuchte, daß man als Normaltemperatur eine Temperatur wählte, bei der die Substanzen flüssig sind. Bell

und Muter wählen die Temperatur von $35,75^{\circ}\text{C} = 100^{\circ}\text{F}$; Archbutt nimmt der Einfachheit wegen als Normaltemperatur den Siedepunkt des Wassers und verfährt dabei in der Weise, daß er das Gewicht des

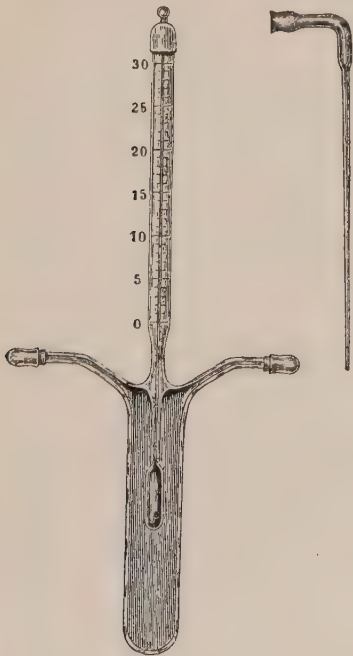


Fig. 16.
Modifikation des Sprengel'schen Pyknometer.

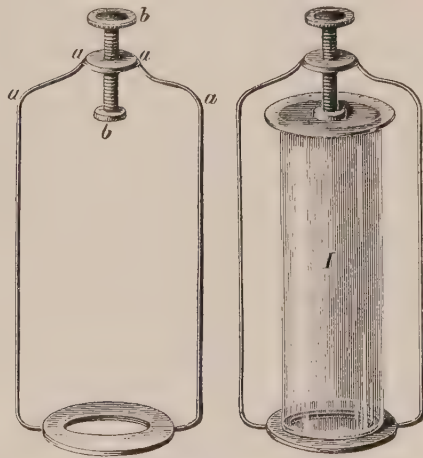


Fig. 17.
Gintl'sches Pyknometer.

Fettes bestimmt, das bei 100°C das von einer bestimmten Gewichtsmenge Wasser bei 15°C eingenommene Volumen erfüllt. Skälweit schlägt daher vor, den Ausdruck „spezifisches Gewicht bei 100°C “ durch „scheinbares spezifisches Gewicht“ zu ersetzen.

Das von Gintl¹⁾ verwendete Pyknometer zur Bestimmung des spezifischen Gewichtes fester Fette und Wachsorten bei gewöhnlicher Temperatur besteht aus einem zylindrischen Gefäß mit flachem Boden, das mit einer gut abgeschliffenen Glasplatte verschlossen wird. Das Gefäß wird in den vergoldeten Messingrahmen eingesetzt und mittels der Schraube befestigt. Die Bestimmung wird in der üblichen Weise wie mit einem gewöhnlichen Pyknometer ausgeführt.

Wird die Bestimmung des spezifischen Gewichtes bei einer Temperatur ausgeführt, die zwischen 15 und 100°C liegt, so muß eine von dem Ausdehnungskoeffizienten des Öles abhängige Korrektur angebracht werden. Allen²⁾

¹⁾ Gintl, Dinglers Polytechn. Journal **194**, 42.

²⁾ Allen, Commercial organic analysis **11**, 19.

fand, daß alle von ihm untersuchten nicht trocknenden fetten Öle, mit Ausnahme von Walfischtran, bei gleicher Temperaturerhöhung (für 1° C) eine fast gleiche Ausdehnung haben, die sich zwischen 0,000615 und 0,000665 bewegt, und schlug vor, die mittlere Korrektur für 1° C mit 0,00064 zu setzen.

Beispiel: Ein Öl hat bei 22° C das spezifische Gewicht 0,921, wie groß ist das spezifische Gewicht bei 15°? Die Temperaturdifferenz ist: 22—15 = 7°; Korrektur: $0,00064 \times 7 = 0,00448$, spezifisches Gewicht bei 15° C: $0,921 + 0,00448 = 0,92548$.

7. Lichtbrechungsvermögen.

Bei der Analyse der flüssigen und festen Fette bietet die Bestimmung des Brechungsvermögens, wenn nicht ein vollständig zuverlässiges Mittel zum Nachweis von Verfälschungen, so doch sehr wichtige Anhaltspunkte zur Beurteilung derselben.

Unter Brechungsverhältnis, Brechungsindex oder Brechungsexponent n versteht man den Quotienten aus dem Sinus des Einfallswinkels α und dem Sinus des Brechungswinkels β ; $n = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta}$. Wenn

das Licht aus Luft in eine bestimmte Flüssigkeit übergeht, so bleibt dieses Verhältnis immer konstant, wie groß auch der Einfallswinkel sein mag, es ändert sich nur mit der Natur der Flüssigkeit und stellt eine charakteristische Eigenschaft derselben dar. Für den Fall, daß das Licht in ein stärker brechendes Medium übergeht, entspricht jedem Einfallswinkel auch ein Brechungswinkel. Im umgekehrten Falle vermag bei einem bestimmten Einfallswinkel der Lichtstrahl nicht mehr in das dünnere Medium überzugehen, sondern wird in das stärker brechende Medium zurückgeworfen — bei einem bestimmten Winkel tritt also Totalreflexion ein, d. h. das Licht vermag dann nicht mehr auszutreten.

Auf diesem Prinzip beruhen alle im Gebrauch befindlichen Refraktometer.

8. Optisches Drehungsvermögen.

Klare und helle Öle können direkt zur Bestimmung der Polarisation verwendet werden; trübe Öle müssen sorgfältig filtriert und dunkle mit reiner Tierkohle entfärbt werden. Werden die Öle dabei nicht genügend klar und hell, so werden sie mit Petroläther verdünnt. Ebenfalls löst man feste Fette in Petroläther.

Am besten eignen sich für die Bestimmung des optischen Drehungsvermögens der Fette und Öle die Halbschattenapparate.

9. Viskosität.

Als spezifischen Reibungs- oder Viskositätskoeffizienten bezeichnet man die Zeit, die eine Flüssigkeit braucht, um durch eine Kapillarröhre zu fließen, wenn ein gleiches Volumen Wasser von bestimmter Temperatur durch dieselbe Röhre in der Zeit Eins fließen würde.

Der Quotient, den man durch Division der Ausflußzeit eines

Öles durch die des Wassers bei 20° C erhält, wird in der Praxis Viskositätsgrad genannt. Die Viskosität des Rizinusöls ist z. B. nach Schübler $\frac{1830''}{9''} = 203,3$. Vielfach wird in der Praxis statt Wasser Rüböl als Einheit angewendet, indem man dessen Ausflußzeit bei 20° C gleich 100 setzt. Den Viskositätsgrad auf Rüböl bezogen, berechnet man dann nach der Formel

$$V^0 = \frac{t \times 100}{t_1},$$

wo t die Auslaufszeit des Rüböls, t_1 die des zu vergleichenden Öles bedeutet.

Für gewöhnliche Bestimmungen wendet man ein weites, unten zu einem Ausflußrohr von etwa 2 mm Durchmesser ausgezogenem Glasrohr an, das oben und unten mit Marken versehen ist. Schübler benutzte bei seinen Bestimmungen ein Glasrohr von 2 cm Durchmesser, 10 cm Höhe, das in ein Ausflußrohr von 1,6 mm Durchmesser endete.

VI. Quantitative Untersuchung der Fette, Öle und Wachse.

Zu den quantitativen Reaktionen gehören folgende Untersuchungsmethoden, die in der Ermittlung gewisser, von der Natur der einzelnen Fettsäuren abhängiger Zahlenwerte bestehen.

Man unterscheidet unter diesen Werten „Konstanten“ und „Variablen“. Unter Konstanten versteht man diejenigen Werte, die für die Natur eines Fettes, Öles oder Wachses charakteristisch sind; unter Variablen versteht man Zahlen, die von der Art der Reinigung des Rohproduktes, der Ranzidität, dem Alter und anderen Umständen abhängen. Zu den ersteren gehören: die Verseifungszahl, Reichert-Meißlsche Zahl, die Hehnersche Zahl und die Jodzahl. — Zu den Variablen gehören: die Säurezahl, die Glyzerinmenge, Monoglyzeride und Diglyzeride und unverseifbare Bestandteile. Die Azetylzahl nimmt eine Mittelstellung zwischen beiden Gruppen ein; sie tritt bald als Konstante, bald als Variable auf.

Die Konstanten.

1. Die Verseifungszahl.

Die Verseifungszahl oder Köttstorfersche Zahl gibt die Anzahl Milligramme Kalihydrat an, die erforderlich sind, um 1 g Fett oder Wachs vollständig zu verseifen oder mit anderen Worten die zur Verseifung eines Fettes oder Wachses erforderliche Menge Kalihydrat in Zehntelprozenten.

Die Ausführung dieses Verfahrens erfordert eine $\frac{1}{2}$ Normal-salzsäure, deren Titer auf Kalihydrat berechnet ist und eine alkoholische Kalilauge von ungefähr derselben Konzentration. Die Kalilauge stellt man dar, indem man etwa 40 g festes, mittels Alkohol

gereinigtes Ätzkali in einem Liter 95prozentigen Alkohols durch Kochen löst, die Lösung 24 Stunden stehen läßt und dann filtriert. Die Lauge wird an einem kühlen Orte aufbewahrt.

Die Bestimmung der Verseifungszahl führt man in folgender Weise aus. Man wägt 1—2 g Fett in einem Kölbchen (aus böhmischem oder Jenaglas) von 150 ccm Inhalt ab, setzt 25 ccm einer $\frac{1}{2}$ normalen alkoholischen Kalilauge hinzu, versieht den Kolben mit einem als Rückflußkühler dienenden Glasrohr und erhitzt die Mischung auf dem kochenden Wasserbade 15 Minuten lang, bei schwer verseifbaren Fetten 30 Minuten, zum schwachen Sieden, indem man den Kolbeninhalt von Zeit zu Zeit umschwenkt. Das Ende der Verseifung ist daran zu erkennen, daß der Kolbeninhalt eine gleichmäßige, vollkommen klare Flüssigkeit darstellt, in der keine Fettkügelchen mehr sichtbar sind. Hierauf fügt man einige Tropfen Phenolphthaleinlösung hinzu und titriert die noch heiße Seifenlösung mit $\frac{1}{2}$ Normalsalzsäure zurück. Die Grenze der Neutralisation ist sehr scharf, wobei die Flüssigkeit beim Übergang in die saure Reaktion rein gelb gefärbt wird.

Da sich der Titer der Kalilauge bei Luftzutritt, besonders beim Erwärmen durch die Oxydation des Alkohols, etwas verringert, so empfiehlt es sich, bei Beginn eines Versuches 25 ccm davon 15 Minuten lang, wie bei der Bestimmung der Fette, auf dem Wasserbade zum schwachen Sieden zu erhitzen und dann mit $\frac{1}{2}$ Normalsalzsäure zu titrieren. Die Differenz zwischen der ungekochten und erhitzten Kalilösung beträgt etwa $\frac{1}{10}$ ccm $\frac{1}{2}$ Normalsalzsäure.

Schwefelsäure kann man nicht zum Titrieren verwenden, weil sich ein in Alkohol unlöslicher Niederschlag von Kaliumsulfat bildet, der die Deutlichkeit der Endreaktion beeinträchtigt.

Die Differenz der Anzahl Kubikzentimeter Salzsäure, die zur Titerstellung der Kalilauge und zum Zurücktitrieren der Seifenlösung verbraucht wurden, entspricht der zur Verseifung erforderlichen Menge Kalihydrat.

Beispiel: 1,7955 g Fett wurden mit 25 ccm Kalilauge verseift und zum Zurücktitrieren 8,9 ccm $\frac{1}{2}$ Normalsalzsäure verbraucht. 25 ccm alkoholische Kalilauge entsprechen 23,5 ccm Salzsäure, 1 ccm Salzsäure = 28,1 mg Kaliumhydroxyd, folglich sind $23,5 - 8,9 = 14,6$ ccm Salzsäure entsprechende Menge Kaliumhydroxyd zur Verseifung des Fettes verbraucht worden, woraus sich die Verseifungszahl nach folgender Gleichung berechnen läßt:

$$V = \frac{14,6 \times 28,1}{1,7955} = 228,5.$$

Das von Henriques ¹⁾ vorgeschlagene Verfahren der kalten Verseifung wird bei vulkanisierten Fetten und Ölen angewendet, die beim Kochen mit alkoholischer Kalilauge sehr dunkle Lösungen geben. Die zur Bestimmung der Verseifungszahl dunkler Öle von Mc. Ilhiney empfohlene Methode beruht darauf, daß man 2 g Substanz mit einem Überschuß alkoholischer Kalilauge verseift, den Alkohol verjagt, die Seife mit 250 ccm 93prozentigen Alkohols aufnimmt, dann eine Stunde Kohlensäure durch die Flüssigkeit leitet, wobei das freie Alkali als Karbonat und Bikarbonat gefällt wird. Hierauf wird die Flüssigkeit

¹⁾ Henriques, Journ. Amer. Chem. Soc. **16**, 468 (1894).

filtriert, der Alkohol abdestilliert und das Filtrat mit einer Lösung von 10 g Chlorammonium in 100 ccm Wasser versetzt. Es entwickelt sich Ammoniak, das abdestilliert und in einer gemessenen Menge Salzsäure aufgefangen wird; der Überschuß an letzterer wird zurücktitriert. Die durch das Ammoniak neutralisierte Säure ist der bei der Verseifung des Öles verbrauchten Menge Alkali äquivalent. Die von dem Alkohol gelöste Menge Bikarbonat muß bei der Berechnung in Abzug gebracht werden. 100 ccm 93prozentiger Alkohol lösen eine 0,34 ccm entsprechende Menge Normalsäure.

Allen empfiehlt, anstatt der Verseifungszahl das Verseifungsäquivalent zu bestimmen. Darunter ist die Anzahl Gramme Fett, die durch ein Gramm-Molekül = 56,1 g KOH verseift wird, zu verstehen. Das Verseifungsäquivalent erhält man durch Division von 56100 durch die Verseifungszahl.

2. Die Reichert-Meisslsche Zahl.

Die Reichert-Meisslsche Zahl gibt die Anzahl Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$ Normalkalilauge an, die zur Neutralisation der aus 5 g geschmolzenem und filtriertem Fett abdestillierten, leicht flüchtigen, wasserlöslichen Fettsäuren erforderlich sind.

Die Reichertsche Zahl¹⁾ gibt die Anzahl Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$ Normalkalilauge an, die zur Neutralisation der aus 2,5 g Fett nach folgendem Verfahren abdestillierten flüchtigen Fettsäuren erforderlich sind.

2,5 g wasserfreies, durch Baumwolle filtriertes Fett werden in einem 150 ccm fassenden Erlenmeyerkölbchen mit 1 g festem Kalihydrat und 20 ccm 80prozentigem Alkohol versetzt. Die Mischung wird auf dem Wasserbade unter öfterem Umrühren erwärmt, bis die erhaltene Seife eine nicht mehr aufschäumende, schmierige Masse bildet. Hierauf löst man die Seifen durch Hinzufügen von 50 ccm Wasser und zerlegt sie mit 20 ccm verdünnter Schwefelsäure (1 : 10). Den Inhalt des Kölbchens unterwirft man dann der Destillation, wobei man durch die Flüssigkeit einen schwachen Luftstrom leitet, um das Stoßen zu vermeiden. Es empfiehlt sich auch, das Kölbchen mit einer Kugelhöhre zu verbinden, um ein Überhitzen von Schwefelsäure zu verhüten. Das Destillat wird durch ein Filter in eine 50 ccm fassende Vorlage filtriert, wobei man die zuerst übergegangenen 10—20 ccm in das Kölbchen zurückgießt, setzt hierauf die Destillation fort, bis das Kölbchen genau 50 ccm Destillat enthält. Das Destillat bildet eine wasserhelle Flüssigkeit, die man mit einigen Tropfen Lackmustinktur oder Phenolphthaleinlösung versetzt und mit $\frac{1}{10}$ Normallauge titriert.

Meissls Modifikation des Reichertschen Verfahrens be-

¹⁾ E. Reichert, Vereinfachte Butterprüfung nach Hehners Prinzip. Zeitschr. f. analytische Chemie **18**, 69 (1879).

steht darin, daß er die doppelte Menge Fett anwendet, um die Titrierungsfehler auf solche Weise zu verkleinern, ferner einen schwächeren Alkohol bei der Verseifung zu benutzen empfiehlt, um einem Verlust an flüchtigen Fettsäuren durch Ätherifikation vorzubeugen. Durch Zusetzen von Bimssteinstücken erzielt man ein ruhiges Sieden der Flüssigkeit bei der Destillation und somit erübrigt sich das unbequeme Durchleiten eines Luftstromes.

Meissl¹⁾ verfährt in der Weise, daß er 5 g geschmolzenes und filtriertes Fett in einem 200 ccm fassenden Kölbchen mit 2 g festem Ätzkali und 50 ccm 70prozentigem Alkohol auf dem Wasserbade unter Umschütteln bis zum Verschwinden der öligen Tröpfchen erhitzt und die klare Seifenlösung dann bis zur vollständigen Verflüchtigung des Alkohols eindampft. Den Seifenleim löst man in 100 ccm Wasser und zersetzt mit 40 ccm verdünnter Schwefelsäure (1 : 10). Hierauf beschickt man den Kolben mit einigen Bimssteinstückchen, verbindet ihn mittels eines knieförmig gebogenen Kugelrohres mit einem Liebigschen Kühler und unterwirft den Inhalt der Destillation, die in etwa einer Stunde beendet ist. 110 ccm des Destillats werden in einem graduiertem Gefäße aufgefangen, dann filtriert und vom Filtrate 100 ccm nach Zusatz von einigen Tropfen Lakmustinktur oder Phenolphthaleinlösung mit $\frac{1}{10}$ Normalkalilauge titriert. Die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter Kalilauge muß um $\frac{1}{10}$ vermehrt werden, um der Gesamtmenge des Destillats zu entsprechen.

Der zum Verseifen anwendbare Alkohol muß frei von flüchtigen Säuren und Aldehyd, ferner das Ätzkali nicht zu sehr mit Nitraten und Chloriden verunreinigt sein, um nicht im Destillat freie Säuren zu erhalten. Es empfiehlt sich daher, einen Blindversuch, d. h. ohne Hinzufügen eines Fettes anzustellen und die zur etwaigen Sättigung des Destillats erforderliche Menge $\frac{1}{10}$ Normalalkali von der bei der Bestimmung der Reichert-Meisslschen Zahl der Fette gefundenen Werte abzuziehen.

3. Die Hehnersche Zahl.

Die Hehnersche Zahl gibt die Menge der in 100 Teilen Fett enthaltenen unlöslichen Fettsäuren an.

Hehner verfährt in der Weise, daß er etwa 3—4 g des getrockneten und filtrierten Fettes mittels eines Glasstabes in eine Porzellanschale von 12.5 cm Durchmesser bringt, 50 ccm Alkohol und 1—2 g Ätzkali hinzufügt und auf dem Wasserbade erwärmt, wobei sich das Butterfett mit Leichtigkeit zu einer klaren, gelben Flüssigkeit löst und sich ein starker Geruch nach Buttersäureester bemerkbar macht. Man erwärmt ungefähr 5 Minuten lang und setzt dann tropfenweise destilliertes Wasser zu; entsteht dadurch eine Trübung von ausgeschiedenem, unzersetztem Fett, so erhitzt man etwas länger, bis die Flüssigkeit auf Zusatz von Wasser sich nicht mehr trübt. Die klare Seifenlösung wird zur Entfernung des Alkohols auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz eingedampft, der Rückstand in 100—150 ccm Wasser ge-

¹⁾ E. Meissl, Untersuchung über die Verfälschung des käuflichen Butterschmalz. Dingl. 233, 229 (1879).

löst und die klare Flüssigkeit mit Salz- oder Schwefelsäure bis zur stark sauren Reaktion versetzt. Die unlöslichen Fettsäuren scheiden sich als käsige Masse ab, das Erhitzen wird eine halbe Stunde lang fortgesetzt, bis die Fettsäuren zu einem klaren Öl geschmolzen sind. Nun filtriert man durch ein vorher bei 100° getrocknetes und gewogenes Filter von dichtestem schwedischem Filtrierpapier, wobei man das Filter zuerst halb mit Wasser füllt und dann erst die Flüssigkeit aufgießt. Die Fettsäuren wäscht man auf dem Filter mit kochendem Wasser auf das sorgfältigste aus, bis das Filtrat, mit Lackmustinktur geprüft, nicht mehr sauer reagiert (3 g Fett gebrauchen gewöhnlich $\frac{3}{4}$ Liter kochendes Wasser). Hierauf läßt man das Wasser abtropfen und setzt den Trichter in ein mit kaltem Wasser gefülltes Becherglas, so daß das Niveau im Trichter und Becherglas ziemlich gleich steht. Nach dem Erstarren der Fettsäuren bringt man das Filter in ein toniertes Glas und trocknet bei 100° C bis zu annähernder Gewichtskonstanz. Man wägt nach 2 Stunden, dann abermals nach 2½ Stunden. Meistens nimmt zwischen den zwei Wägungen das Gewicht nicht mehr als um ein Milligramm ab. Völlige Gewichtskonstanz kann man nicht erwarten, da bei längerem Trocknen eine Oxydation und somit Gewichtszunahme eintreten kann.

4. Die Jodzahl.

Die Jodzahl gibt an, wieviel Prozente Jod ein Fett, Öl, Wachs oder Fettsäure aufzunehmen vermag.

Fast alle Fette enthalten Glieder aus verschiedenen Gruppen von Fettsäuren; Säuren der Essigsäurereihe, der Ölsäure-, Linolsäure- und Linolensäurereihe. Alle diese Gruppen von Fettsäuren zeigen einen sehr charakteristischen Unterschied in ihrem Verhalten gegen Haloide. Während die erste Gruppe sich gegen Haloide indifferent verhält, addiert die zweite zwei Atome, die Linolsäuregruppe vier und die Linolensäuregruppe sechs Atome eines Haloides. Bestimmt man die Menge des addierten Halogens, so erhält man eine für jedes Fett fast konstante Zahl, die von der Art und relativen Menge ungesättigter Säuren abhängt.

Die Bromaddition.

Der Versuch von Cailletet, die von einem Fett oder Öl absorbierte Menge Brom durch Titrierung des überschüssigen Broms mit einer Lösung von β -Naphthol in Tetrachlorkohlenstoff, ist nicht gelungen und kann nicht empfohlen werden, da die Menge der absorbierten mit der theoretisch berechneten Brommenge sehr groß ist.

Zur Bestimmung der Bromabsorptionszahl wendet Telle¹⁾ ein Verfahren an, das auf der Umsetzung von Natriumhypochlorit mit Kaliumbromid bei Gegenwart der Fette beruht. Der Titer der Hypo-

¹⁾ Fernand Telle, Über die Absorption von Brom durch Fette. Neue Methode zur rationalen Bestimmung der Bromzahl. Journ. de Pharm. et de Chim. (6) 21, 111 u. 183 (1905).

chloritlösung wird auf Arsenitlösung, die 4,95 g As_2O_3 im Liter enthält und durch 8 g Brom oxydiert wird, eingestellt.

Man wägt 1,25 g Fett oder Öl, von trocknenden Ölen nur 0,625 g ab, löst es in Chloroform oder besser in Tetrachlorkohlenstoff und füllt auf 50 ccm auf. 10 ccm dieser Lösung werden in einem 500 ccm fassenden Erlenmeyerkolben mit 5 ccm einer 10prozentigen Bromkaliumlösung, 1 ccm Salzsäure und einer abgemessenen Menge der Hypochloritlösung im Überschuß, der nicht mehr als 5—6 ccm betragen soll, versetzt. Hierauf wird der Überschuß des freien Broms mittels des Arsenits bestimmt, indem man davon eine zur Absorption des Broms mehr als ausreichende Menge zusetzt und mit der Hypochloritlösung das nicht gebundene As_2O_3 zurücktitriert, wobei das Auftreten einer gelblichen Färbung in der Flüssigkeit das Ende der Reaktion anzeigt. Die Berechnung des von dem Fette absorbierten Broms geschieht wie gewöhnlich.

1 Gramm-Molekül reine Ölsäure absorbierte nach diesem Verfahren 159,6 g Brom, diese Zahl stimmt mit der theoretisch berechneten Menge überein und ist unabhängig von der Einwirkungsdauer. Auch bei den ungesättigten Fettsäuren darf die Dauer der Bromeinwirkung nicht über 20 Minuten ausgedehnt werden.

Jodaddition.

Die Verwendung von Jod statt Brom schien bequemer zu sein, doch zeigte sich in verschiedenen Versuchen, daß Jod bei gewöhnlicher Temperatur nur sehr träge auf Fette einwirkt, bei hoher Temperatur in seinen Wirkungen ungleichmäßig ist und keine glatten Reaktionen gibt. Dagegen wirkt eine alkoholische Jodlösung bei Gegenwart von Quecksilberchlorid schon bei gewöhnlicher Temperatur auf die ungesättigten Fettsäuren unter Bildung von Chlorjodadditionsprodukten und läßt die gesättigten Fettsäuren unverändert. Auf dieser Eigenschaft der Jodquecksilberchloridlösung beruht die Hübische Methode.¹⁾

Zur Ausführung der Hübischen Methode sind erforderlich:

1. Jodlösung (Jodquecksilberchloridlösung). Man löst einerseits etwa 25 g Jod in 500 ccm, andererseits 30 g Quecksilberchlorid im gleichen Volumen 95prozentigen, fuselfreien Alkohols, filtriert letztere Lösung und vereint dann beide Lösungen. Da der Titer dieser Lösung sich anfangs infolge Bildung von Jodwasserstoffsäure rasch ändert, kann die Lösung erst nach 12—24stündigem Stehen in Gebrauch genommen werden. Der Titer dieser Lösung muß vor jedem Versuch resp. Versuchsreihe neu gestellt werden. Es ist auch ratsam, beide Lösungen getrennt aufzubewahren und 24 Stunden vor dem Gebrauch zu gleichen Teilen zu mischen.

2. Natriumthiosulfatlösung. Man löst etwa 24 g des Salzes in 1 Liter Wasser und bestimmt den Titer mit reinem sublimierten Jod.

3. Das Chloroform prüft man vor seiner Verwendung auf die Reinheit, indem man 10 ccm desselben mit 10 ccm der Jodlösung versetzt und nach 2—3 Stunden die Jodmenge sowohl in dieser Flüssigkeit, als auch in 10 ccm der Vorratslösung maßanalytisch bestimmt. Erhält man in beiden Fällen vollkommen übereinstimmende Resultate, so ist das Chloroform brauchbar.

4. Jodkaliumlösung. Am besten benutzt man eine 10prozentige wässrige Lösung.

¹⁾ O. Hübl, Eine allgemein anwendbare Methode zur Untersuchung der Fette. Dingl. Polyt. Journ. 253, 281 (1884).

Die Stärkelösung bereitet man am besten für jeden Versuch vor, indem man eine Messerspitze löslicher Stärke mit etwas destilliertem Wasser unter Umrühren erhitzt.

Die Bestimmung der Jodzahl führt man in folgender Weise aus. Man löst in einer 500—800 ccm fassenden Stöpselflasche von trocknenden Ölen 0,2—0,3 g, von nicht trocknenden 0,3—0,4 g, von festen Fetten 0,8—1,0 g in 10—15 ccm Chloroform und fügt 20—25 ccm Jodlösung hinzu. Man schließt sofort die Flasche, schüttelt gut durch, wobei sich eine klare Lösung bildet; ist dies nicht der Fall, so wird noch etwas Chloroform zugesetzt. Tritt in kurzer Zeit eine fast vollständige Entfärbung der Flüssigkeit ein, so läßt man noch 20 bis 25 ccm Jodlösung zufließen. Die Jodmenge muß so groß sein, daß die Flüssigkeit nach 2 Stunden noch stark braun gefärbt erscheint. Nach dieser Zeit kann man die Reaktion für beendet halten, doch läßt man vorsichtshalber noch weitere 4 Stunden stehen. (Lewkowitsch empfiehlt, bei festen Fetten und nicht trocknenden Ölen 6—8 Stunden, bei trocknenden Ölen 12—18 Stunden stehen zu lassen.) Um nun die Menge des noch freien Jods zu bestimmen, versetzt man das Reaktionsprodukt mit 15—20 ccm Jodkaliumlösung (1 : 10), schüttelt um, und verdünnt mit etwa 150 ccm Wasser. Sollte dabei ein roter Niederschlag von Quecksilberjodid ausfallen, so muß man noch etwas Jodkaliumlösung zusetzen. Das freie Jod ist teils in der wässerigen Lösung, teils im Chloroform enthalten. Man läßt aus einer Bürette unter fortwährendem Umschwenken solange Natriumthiosulfatlösung zufließen, bis die wässerige Lösung sowie die Chloroformschicht nur schwach gelb gefärbt sind. Nun setzt man etwas Stärkelösung zu und titriert zu Ende. Unmittelbar vor oder nach dem Versuche werden 20 oder 25 ccm der Jodlösung unter Zusatz von Jodkalium und Stärkelösung in der oben angegebenen Weise titriert. Die Differenz zwischen diesen beiden Bestimmungen ergibt unter Berücksichtigung des Titors der Natriumthiosulfatlösung die vom Fette gebundene Jodmenge. Die gefundene Jodmenge berechnet man auf Prozente des angewandten Fettes und bezeichnet diese Zahl als Jodzahl.

Da sich bei der Bestimmung der Jodzahl die geringsten Versuchsfehler in besonders hohem Maße multiplizieren, so ist ein sorgfältigstes Arbeiten erforderlich. Zum Abmessen der Lösungen sind genau eingeteilte Pipetten und Büretten, und zwar für jede Lösung stets das gleiche Meßinstrument zu verwenden.

Die Wijssche¹⁾ Modifikation beruht auf der Anwendung einer Lösung von Jodmonochlorid in Eisessig, die vor der Hüblschen den Vorzug hat, daß sie in ihrer Wirksamkeit viel beständiger und die Reaktionsfähigkeit eine höhere und schnellere ist. Zur Ausführung der Bestimmung sind erforderlich:

1. Jodmonochloridlösung. a) Man löst 13 g Jod in 1 Liter reinem konzentriertem Eisessig (beim Erhitzen mit Kaliumbichromat und konzen-

¹⁾ Wijs, Ber. 31, 750 (1898). Chem. Revue d. Fett- u. Harzind. 6, 5 (1899). Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel 5, 497, 1150, 1193 (1902).

trierter Schwefelsäure darf keine grüne Färbung entstehen), bestimmt in 25 ccm dieser Lösung genau den Titer und leitet in die Lösung einen langsamen Strom von gewaschenem und getrocknetem Chlorgas ein, bis der Titer der Lösung verdoppelt ist. Dieser Punkt ist bei einiger Übung scharf zu unterscheiden, da ein sehr deutlicher Farbumschlag eintritt. b) Aus Jodtrichlorid und Jod stellt man die Lösung dar, indem man 9 g Jodtrichlorid in 1 Liter reinem konzentrierten Eisessig löst, 5 ccm davon mit einigen Kubikzentimetern einer 10prozentigen Jodkaliumlösung und etwas Wasser versetzt und den Titer mit $\frac{1}{10}$ Normalthiosulfatlösung titriert. Hierauf löst man in der Jodtrichloridlösung soviel fein zerriebenes Jod, bis der Titer etwas mehr als $1\frac{1}{2}$ mal so groß wird. Lewkowitsch löst einerseits 9,4 g Jodtrichlorid, andererseits 7,2 g Jod auf dem Wasserbade in Eisessig, gießt beide Lösungen in einen Literkolben und füllt mit Eisessig bis zur Marke auf.

2. Tetrachlorkohlenstoff. Beim Schütteln mit Kaliumbichromatlösung und konzentrierter Schwefelsäure darf auch nach längerem Stehen keine Färbung eintreten. Der Tetrachlorkohlenstoff wird vorgezogen, da das Chloroform stets etwas Alkohol enthält.

3. Stärkelösung, Jodkaliumlösung und Thiosulfatlösung stellt man wie bei dem Hüblschen Verfahren dar.

Die Ausführung geschieht in derselben Weise wie bei dem Hüblschen Verfahren, nur mit sehr wenigen Abweichungen. Man verwendet bei trocknenden Ölen 0,15—0,18 g, bei nichttrocknenden 0,3—0,4 g, bei festen Fetten 0,8—1,0 g; ferner genügen 10 ccm 10prozentiger Jodkaliumlösung; der Jodüberschuß beträgt etwa 70 Proz., d. h. es sollen nur 30 Proz. vom zugesetzten Jod zur Addition verbraucht werden. Die Einwirkungsdauer beträgt bei festen Fetten und Ölen mit niedriger Jodzahl 15 Minuten; bei Ölen mit höherer Jodzahl $\frac{1}{2}$ Stunde und bei Leinöl eine Stunde. Nach Lewkowitsch ist bei halbtrocknenden Ölen $\frac{1}{2}$ —1 Stunde erforderlich, bei trocknenden Ölen 1—2 Stunden.

An Stelle der Jodmonochloridlösung hat J. Hanuš die Anwendung einer Jodmonobromidlösung in Eisessig empfohlen, die vor der ersteren den Vorzug haben soll, daß sie leichter hergestellt werden kann, und daß eine Einwirkungsdauer von 15 Minuten auch bei trocknenden Ölen genügt.

Unter wirklicher Jodzahl verstehen Tolman und Munson die Differenz zwischen der Hüblschen Zahl und der Jodzahl der flüssigen Fettsäuren. Die Differenz steigt mit dem Gehalt an festen Fettsäuren, die die Hüblsche Jodzahl beeinflussen. Die wirkliche Jodzahl eines Öles berechnen Tolman und Munson aus der Hüblschen Zahl und dem Prozentgehalt des Öles an festen Fettsäuren, unter der Annahme, daß der Gesamtfettsäuregehalt eines Öles 95,5 Proz. beträgt, nach folgender Formel:

$$\frac{A = J \cdot 100}{L},$$

worin A = Jodzahl der flüssigen Fettsäuren, J = Hüblsche Jodzahl, L = Prozentgehalt an flüssigen Fettsäuren (Gesamtfettsäuren minus feste Fettsäuren).

5. Die Säurezahl.

Die Säurezahl gibt die Menge Kalihydrat in Zehntelprozenten oder die Anzahl Milligramme Kalihydrat an,

die erforderlich ist, um die in 1g Fett oder Wachs enthaltenen freien Fettsäuren zu neutralisieren, und bildet daher ein Maß für den Gehalt des Fettes oder Wachses an freien Fettsäuren.

Zur Ermittlung der Säurezahl titriert man das in Methyl-, Äthyl-, Amylalkohol, oder in einem Gemisch von Alkohol und Äther resp. Äthyl- und Amylalkohol (1 : 2) gelöste Fett oder Wachs (10 g) mit alkoholischer $\frac{1}{10}$ Normalkalilauge unter Benutzung von Phenolphthalein als Indikator. Der Endpunkt der Titration ist deutlich erkennbar, da eine Verseifung des Neutralfettes durch den hinzugesetzten geringen Überschuß von Alkali nicht sofort eintritt. Am zweckmäßigsten löst man das Fett in einem Gemisch aus 2 Teilen Äther und einem Teil Alkohol; die Lösung bleibt dann während der Titration klar.

Feste Fette werden mit säurefreiem Alkohol auf dem Wasserbade erwärmt, bis sie sich gelöst haben. Falls sich während der Titration ein Teil des Fettes ausscheidet, so setzt man den Kolben auf das Wasserbad zurück und titriert hierauf zu Ende; bei Anwendung eines anderen Lösungsmittels resp. Gemisches setzt man neue Mengen des Lösungsgemisches bis zur vollständigen Lösung des Fettes hinzu und führt die Titration zu Ende.

Enthält ein Öl noch von der Reinigung her freie Mineralsäuren, so bestimmt man dieselben, indem man das Öl mit Wasser ausschüttelt, die wässrige Schicht von dem Öl trennt und titriert. Die zur Analyse angewendeten Lösungsmittel müssen säurefrei sein oder vor der Verwendung mit $\frac{1}{10}$ Normalkalilauge unter Zusatz von Phenolphthalein neutralisiert werden.

Die Säurezahl berechnet man nach folgender Formel:

$$S = \frac{m \times n}{a} \cdot 1000,$$

wo S = Säurezahl, m = Titer der Kalilauge, n = verbrauchte Kubikzentimeter, a = die angewandte Menge Fett.

Die freien Fettsäuren werden oft als Ölsäure berechnet und die Menge in Prozenten ausgedrückt, die leicht aus der Säurezahl berechnet werden, da 1 Molekül Kalihydrat (56,1) einem Molekül Ölsäure (282) entspricht und da die Säurezahl die Menge Kalihydrat in Zehntelprozenten ausgedrückt wird:

$$\text{Prozente Ölsäure} = \frac{S \times 282}{10 \times 56,1} = S \times 0,5026.$$

6. Die Ätherzahl.

Die Ätherzahl gibt an, wieviel Milligramm Kalihydrat zur Verseifung des Neutralfettes in 1g Fett oder Wachs erforderlich sind. Sie ist bei Fetten oder Wachsen mit freier Fettsäure die Differenz zwischen Verseifungszahl und Säurezahl.

Die Bestimmung der Ätherzahl geschieht in der Weise, daß man

in 2 g der Probe die freie Fettsäure mit $\frac{1}{2}$ Normallauge neutralisiert, das Lösungsmittel verjagt und den Rückstand verseift (siehe unter Verseifungszahl); die Zahl Kubikzentimeter Alkali entspricht dem vorhandenen Neutralfett.

Da die Ätherzahl genau denselben Schwankungen unterworfen ist, wie die Säurezahl, so wird sie deshalb als eine variable betrachtet. Eine besondere Bedeutung hat sie bei der Bestimmung des Glycerin-gehaltes einer Probe und bei der Untersuchung des Bienenwachses, für das das Verhältnis der Säurezahl zur Ätherzahl charakteristisch ist.

7. Die Azetylzahl.

Die Azetylzahl gibt die Anzahl Milligramme Ätzkali an, die zur Neutralisation der bei der Verseifung eines Grammes azetylierten Fettes oder azetylierter Fettsäuren gebildeten Essigsäure erforderlich ist.

Die von Benedikt zuerst in der Fettanalyse eingeführte Azetylzahl ermöglicht, den Gehalt eines Fettes an Hydroxylgruppen quantitativ zu bestimmen und gibt demnach ein Maß für den Gehalt dieses Fettes an Oxyfettsäuren oder Fettalkoholen. Das von Benedikt und Ulzer¹⁾ vorgeschlagene Verfahren zur Bestimmung der Azetylzahl von Fettsäuren beruht auf folgendem Prinzip. Wird ein Gemenge von Fettsäuren mit Essigsäureanhydrid behandelt, so werden nur die Oxy Säuren azetyliert, während alle anderen Fettsäuren unverändert bleiben, so daß beim Neutralisieren der Fettsäuren mit Kalilauge vor und nach der Azetylierung nur die Oxy Säuren Unterschiede zwischen der Säurezahl und der Verseifungszahl zeigen, während bei den Säuren ohne Hydroxylgruppen diese Werte wenig verschieden sind.

Man übergießt in einem Kolben 20—50 g der aus dem zu untersuchenden Fett gewonnenen nicht flüchtigen Fettsäuren mit dem gleichen Volumen Essigsäureanhydrid, verbindet den Kolben mit einem Rückflußkühler und kocht eine Stunde. Hierauf bringt man die Mischung in ein Becherglas von 1 Liter Inhalt, versetzt mit 500 bis 600 ccm Wasser und kocht wieder $\frac{1}{2}$ Stunde, wobei man durch ein bis fast an den Boden reichendes Kapillarrohr einen langsamen Kohlen-säurestrom durchleitet, um ein Stoßen der Flüssigkeit zu verhindern. Nach dem Absetzen hebert man das Wasser ab und wiederholt das Auskochen mit Wasser noch dreimal, bis alle Essigsäure entfernt ist (Prüfung mit Lackmuspapier). Die azetylierten Fettsäuren werden im Luftbade durch ein trocknes Filter filtriert, worauf man zur Bestimmung der „Azetyl-Säurezahl“ und der „Azetylzahl“ der Fettsäuren schreitet. Zu diesem Zwecke löst man 3—5 g der azetylierten Fettsäuren in säure- und fuselfreiem Alkohol, titriert unter Zusatz von Phenolphthalein mit $\frac{1}{2}$ Normallauge bis zur Rotfärbung, setzt einen Überschuß von Lauge hinzu, erhitzt auf dem Wasserbade bis zum schwachen Sieden und titriert nach etwa einer halben Stunde mit Salzsäure zurück. Die Summe der Azetylsäurezahl und der Azetylzahl heißt „Azetylverseifungszahl“. Die Azetylzahl kann man auch aus der Differenz

¹⁾ Benedikt und Ulzer, Monatshefte Chem. VIII, 40.

zwischen der Säurezahl und der Verseifungszahl der azetylierten Fettsäuren bestimmen.

Beispiel. 3,379 g azetylierte Fettsäuren aus Rizinusöl erforderten zur Absättigung 17,2 ccm $\frac{1}{2}$ Normalalkalilauge, entsprechend $17,2 \times 0,02805 \text{ g} = 0,4825 \text{ g}$ Kalihydrat, woraus sich die Azetylsäurezahl zu $482,5 : 3,379 = 142,5$ ergibt. Zu der neutralisierten Probe werden noch 32,8 ccm, somit im ganzen 50 ccm $\frac{1}{2}$ Normallauge zugesetzt. Nach dem Kochen wird mit 14,3 ccm $\frac{1}{2}$ Normalsalzsäure zurücktitriert. Somit verbleiben zur Absättigung der abgespaltenen Essigsäure $32,8 - 14,3 = 18,5 \text{ ccm}$ $\frac{1}{2}$ Normalalkalilauge oder $18,5 \times 0,02805 = 0,5189 \text{ g}$ Kalihydrat, woraus sich die Azetylzahl $518,9 : 3,379 = 153,5$ ergibt.

Diese Methode setzt voraus daß Säure- und Verseifungszahl der nicht-azetylierten Fettsäuren identisch sind. Nach den Angaben von Tortelli und Pergami¹⁾ sollen die aus Fetten in üblicher Weise abgeschiedenen Fettsäuren wesentliche Mengen von Anhydriden, die beim Titrieren in der Kälte nicht angegriffen werden, beim Erhitzen mit überschüssiger Lauge aber Alkali binden und somit merkliche Unterschiede in der Säure- und Verseifungszahl der Fettsäuren bedingen können. Der Gehalt an solchen Anhydriden ist bei frischen Ölen ziemlich gering, nimmt aber beim Altern der Öle sowie beim Einblasen von Luft erheblich zu. Tortelli und Pergami haben Differenzen zwischen Säure und Verseifungszahl bis zu 31 Einheiten beobachtet. Diese Differenzen werden sich natürlich auch bei den Säure- und Verseifungszahlen der azetylierten Säuren finden und scheinbare Azetylzahlen bedingen.

Lewkowitsch²⁾ erhielt aber bei der Behandlung der Fettsäuren aus verschiedenen Talgsorten mit Essigsäureanhydrid erheblich geringere Säurezahlen als die Verseifungszahlen waren. Die nächstliegende Annahme, daß die Azetylgruppe in die Ölsäure an die Stelle ihrer Doppelbindung eintritt, bestätigt sich nicht, da die Jodzahl azetylierter, reiner Ölsäure von der der unveränderten Ölsäure nicht abweicht. Daß aber die Azetylierung der Ölsäure bei Behandlung mit Essigsäureanhydrid stattgefunden hatte, bewies der bedeutende Unterschied ihrer Säure- und Verseifungszahl. Lewkowitsch zeigt ferner, daß die Methode von Benedikt-Ulzer deshalb ungenau ist, weil die Säuren durch die Einwirkung des Essigsäureanhydrids teilweise in ihre Anhydride verwandelt werden, die bei der Bestimmung der Azetylzahl durch Verseifung wieder hydrolysiert werden. Besser ist es, die an Stelle der alkoholischen Hydroxylgruppe getretene Azetylgruppe direkt nach der Destillation der Essigsäure im Destillat zu bestimmen. Diese Methode bezieht sich auf die unlöslichen Fettsäuren und nicht auf die Öle und Fette; es ist einfacher, die Fette direkt mit Essigsäureanhydrid zu behandeln und die aufgenommenen Azetylgruppen direkt zu bestimmen.

Lewkowitsch modifiziert die Methode in der Weise, daß er 10 g des zu untersuchenden Fettes mit der doppelten Menge Essigsäureanhydrid 1—2 Stunden in einem Kolben am Rückflußkühler erhitzt. Hierauf bringt er die Mischung in ein 1000 ccm fassendes Becherglas, übergießt sie mit 500—600 ccm kochendem Wasser und erhitzt eine halbe Stunde lang, wobei ein langsamer Kohlensäurestrom durch die Flüssigkeit streicht, um das unangenehme Stoßen zu verhindern. Nach dem Absetzen hebert man das Wasser ab und kocht die Ölschicht dreimal in derselben Weise mit Wasser aus, bis die letzten Spuren von Essigsäure entfernt sind, was man durch Prüfen mit Lackmuspapier leicht feststellen kann. Die azetylierten Fettsäuren werden im Luftbade durch ein trocknes Filter filtriert. Hierauf werden 5 g der azetylierten Fettsäuren durch Kochen mit einer bestimmten

¹⁾ Tortelli und Pergami, Journ. Soc. Chem. Ind. 1890, 600.

²⁾ Lewkowitsch, Beiträge zur Analyse der Fette. Proc. Chem. Soc. 1890, 72. Journ. Soc. Chem. Ind. 1890, 660; 1897, 503.

Menge alkoholischer Kalilauge verseift, der Alkohol verjagt, die Seife in Wasser gelöst und weiter entweder nach dem Destillationsverfahren oder Filtrationsverfahren gearbeitet.

a) Destillationsverfahren. Die Seife wird mit einem Überschuß von verdünnter Schwefelsäure (1 : 10) versetzt und die Flüssigkeit der Destillation im Dampfstrom unterworfen, bis 600—700 ccm Wasser übergegangen sind. Das Destillat versetzt man mit Phenolphthalein und titriert mit $\frac{1}{10}$ Normalkalilauge. Die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter multipliziert man mit 5,61 und dividiert durch das Gewicht der angewandten Substanz, wodurch man die Azetylzahl erhält.

b) Filtrationsverfahren. Man versetzt die Seifenlösung mit einer der angewandten alkoholischen Kalilaugen genau entsprechenden Menge titrierter Schwefelsäure und erwärmt vorsichtig, wobei sich die ausgeschiedenen Fettsäuren an der Oberfläche der Flüssigkeit sammeln. Man filtriert die ausgeschiedenen Fettsäuren ab, wäscht sie mit heißem Wasser aus bis zum Verschwinden der sauren Reaktion und titriert das Filtrat mit $\frac{1}{10}$ Normalkalilauge.

Enthalten Öle oder Fette flüchtige Fettsäuren, so werden die Azetylzahlen zu hoch gefunden. Lewkowitsch unterscheidet „scheinbare“, direkt gefundene und „wahre“ Azetylzahlen. Die wahre Azetylzahl der Fettsäuren erhält man, wenn man die von den Oxyfettsäuren gebundene Azetylgruppe (C_2H_3O), die bei der Verseifung als Essigsäure abgespalten wird, mit Kalilauge titriert. Dies geschieht durch Kochen des azetylierten Produktes mit alkoholischem Kali und Bestimmung der Essigsäure in der oben angegebenen Weise.

8. Glycerin.

a) Bestimmung des Glycerins nach dem Azetinverfahren.

Kocht man Glycerin mit Essigsäureanhydrid, so bildet sich Triazetin, wobei die Reaktion quantitativ verläuft. Löst man nun das Reaktionsgemisch in Wasser und neutralisiert die freie Essigsäure genau mit Natronlauge, so läßt sich die Menge des in Lösung befindlichen Triazetins leicht bestimmen, indem man dieses mit einer bestimmten Menge Natronlauge verseift und den Überschuß zurücktitriert. Dieses Prinzip liegt dem von R. Benedikt und M. Cantor ¹⁾ angegebenen Verfahren zugrunde, das in folgender Weise ausgeführt wird.

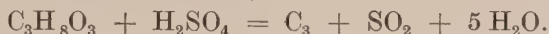
Man bringt 1—1,5 g der zu untersuchenden Probe in ein 100 ccm fassendes Kölbchen, fügt 7—8 g Essigsäureanhydrid und etwa 3 g entwässertes Natriumazetat hinzu und kocht 1—1 $\frac{1}{2}$ Stunden am Rückflußkühler. Nachdem die Mischung sich etwas abgekühlt hat, setzt man 50 ccm warmes Wasser zu und erwärmt am Rückflußkühler bis zum beginnenden Sieden. Hat sich das am Boden befindliche Öl (Triazetin) gelöst, so filtriert man in einen 400—600 ccm fassenden Kolben, fügt nach dem Erkalten des Filtrates Phenolphthalein hinzu und neutralisiert genau mit verdünnter Natronlauge (20 g im Liter).

¹⁾ R. Benedikt und M. Cantor, Über die Bestimmung des Glycerin-
gehaltes bei Rohglyzerinen. Monatsh. Chem. 9, 521.

Hierauf läßt man genau 25 ccm einer 10prozentigen Natronlauge hinzufießen, kocht $\frac{1}{4}$ Stunde und titriert den Überschuß der Natronlauge mit $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{1}$ Normalsalzsäure zurück. In einem blinden Versuch ermittelt man in derselben Weise den Natrongehalt in 25 ccm der 10prozentigen Lauge durch Titrieren mit Normalsalzsäure und findet mithin aus der Differenz zwischen beiden Titrationsen die für die Verseifung des Triazetins verbrauchte Menge Alkali.

b) Bestimmung des Glycerins durch Spaltung mit Schwefelsäure.

Das von Laborde¹⁾ ausgearbeitete Verfahren beruht auf der Zersetzung des Glycerins durch Schwefelsäure unter Bildung von Kohle, nach folgender Gleichung:



F. Jean²⁾ wendet dieses Verfahren bei Fetten und Seifen in folgender Weise an. 10 g Seife (Fett oder Öl verseift man zuerst mit alkoholischer Natronlauge) werden in warmem Wasser gelöst, mit einer konzentrierten Lösung von Zinksulfat gefällt, dann filtriert, der Niederschlag mit warmem Wasser ausgewaschen und das Filtrat nach Zusatz von 10 Tropfen Schwefelsäure im Sandbade bis auf 2 bis 3 ccm eingedampft. Hierauf fügt man 5—6 ccm konzentrierte Schwefelsäure zu, verbindet den Kolben mit einem 500 cm langen Kühlrohr und erwärmt auf dem Sandbade auf ca. 150° C, wobei die Masse schwarz wird. Sobald die ausgeschiedene Kohle in Form von Flocken in der Säure schwimmt, läßt man erkalten, setzt 5 ccm verdünnte Salzsäure (1 : 1) zu und erwärmt bis zum Auftreten weißer Dämpfe. Nun läßt man erkalten, fügt 100 ccm Wasser hinzu, erhitzt zum Kochen, filtriert und wäscht die Kohle mit heißem Wasser aus. Die Kohle spritzt man in eine tarierte Platinschale, fügt einige Tropfen Ammoniak hinzu, verdampft das Wasser im Sandbade und erhitzt den Rückstand bis fast zur Rotglut, wobei sich die geringe Menge von Ammonsalzen verflüchtigt und wägt nach dem Erkalten. Das Gewicht der erhaltenen Kohle, mit 2,5 multipliziert, ergibt die Menge Glycerin.

c) Bestimmung des Glycerins durch Oxydation mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure.

Das Glycerin wird durch Kaliumbichromat und Schwefelsäure vollständig zu Kohlensäure und Wasser oxydiert und, wie Hefner nachgewiesen hat, auch in verdünnter Lösung nach folgender Gleichung:



Die bei der Oxydation entwickelte Kohlensäure kann bei sehr reinen Glycerinen gemessen oder gewogen werden, bei sehr verdünnten Glycerinproben kann die ausgetriebene Kohlensäure nicht bestimmt werden, und es ist daher vorzuziehen, das bei der Oxydation nicht verbrauchte Dichromat zurückzutitrieren.

¹⁾ Laborde, Ann. Chim. anal. appl. 4, 76 (1899).

²⁾ F. Jean, Zur Bestimmung von Glycerin in Fetten und Seifen. Ann. Chim. anal. appl. 5, 211 (1909).

Zur Bestimmung des Glycerins verfährt man nach H ehner in der Weise, daß man das zu untersuchende Fett, etwa 3 g, in bekannter Weise verseift, die Seife mit verdünnter Schwefelsäure zersetzt, von den Fettsäuren abfiltriert und das Filtrat auf die Hälfte eindampft. Hierauf fügt man 25 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 50 ccm von der starken Bichromatlösung hinzu, erhält 2 Stunden auf einer dem Sieden naheliegenden Temperatur und titriert dann, unter Anwendung eines kleinen Überschusses, mit Ferroammoniumsulfatlösung zurück. Der Überschuß an Ferroammoniumsulfat wird mit der verdünnten Bichromatlösung und Ferrozyankalium als Indikator (Tüpfelprobe) bestimmt.

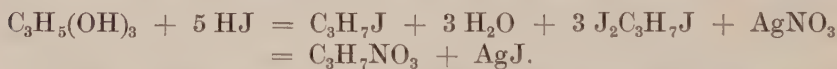
Die Kaliumbichromatlösung enthält 74,64335 g Bichromat und 150 ccm Schwefelsäure im Liter. 1 ccm der Lösung entspricht genau 10 mg Glycerin. Die verdünnte Kaliumbichromatlösung enthält 7,46434 g Bichromat im Liter.

Die Ferroammoniumsulfatlösung enthält etwa 240 g des Salzes im Liter und etwas Schwefelsäure; man stellt die Lösung genau auf die Bichromatlösung ein.

Gelangt zur Untersuchung ein unreines Glycerin, so werden zuerst die Chlor- und Aldehydverbindungen durch Silberoxyd entfernt und die Lösung dann mit basisch essigsaurem Blei versetzt, wodurch alle fetten und harzigen Säuren, alle Albuminoide, Sulfide, Sulfozyanate und Aldehyde gefällt, während die niederen Fettsäuren, wie Essigsäure und Buttersäure, nicht von dem Dichromat angegriffen werden.

d) Bestimmung des Glycerins als Isopropyljodid.

Kocht man Glycerin mit wässriger Jodwasserstoffsäure (vom spezifischen Gewicht 1,7 und Siedepunkt 127°) am Rückflußkühler, so wird es quantitativ in Isopropyljodid umgewandelt, das man in eine alkoholische Lösung von Silbernitrat überdestilliert. In dieser Lösung setzt es sich glatt zu Silberjodid um nach folgender Gleichung:



Diese Umsetzung findet in gleicher Weise auch bei Glycerinestern statt, bei denen Jodwasserstoff zuerst verseifend wirkt. Dieses Prinzip haben S. Zeisel und R. Fanto ihrem Verfahren zur Bestimmung des Glycerins zugrunde gelegt.

Zum Überdestillieren des gebildeten Isopropyljodids verwenden Zeisel und Fanto einen besonderen Apparat. Die zu untersuchende Substanz wird in das Kochkölbchen des Apparates gebracht, dann fügt man ein Bimssteinstückchen sowie 15 ccm der wässrigen Jodwasserstoffsäure zu, verbindet das Kölbchen sofort mit dem Kühler und destilliert unter gleichzeitigem Durchleiten von Kohlensäure (drei Blasen in der Sekunde) bei mäßigem Sieden unter Benutzung eines Glycerinbades. Ist die zu analysierende Substanz fest, so wird Jodwasserstoffsäure vom spezifischen Gewicht 1,7 (57prozentig), bei Flüssigkeiten solche vom spezifischen Gewicht 1,9 (ca. 68prozentig) verwendet. Das Destillat leitet man durch einen auf 60 + 10° C erwärmten Kühler in einen zu 1/3 mit amorphem roten Phosphor gefüllten, ebenfalls auf 60° erwärmten Blasenähler, wo es von den Jod- und

Jodwasserstoffdämpfen befreit wird und gelangt von hier in einen mit 45 ccm einer alkoholischen Lösung von Silbernitrat beschickten Erlenmeyerkolben, in dem die Umsetzung des Isopropyljodids zu Silberjodid erfolgt. Zur Sicherheit legt man ein zweites kleines, mit 5 ccm Silbernitratlösung beschicktes Kölbchen vor. Die Dauer der Destillation nimmt etwa 2—4 Stunden in Anspruch. Nun bringt man das Destillat in ein Becherglas, verdünnt auf etwa 450 ccm, versetzt mit 10—15 Tropfen verdünnter Salpetersäure, erwärmt auf dem Wasserbade, saugt das Silberjodid durch ein Asbestfilterröhrchen ab, wäscht mit Wasser, dann mit Alkohol nach und trocknet bei 120—130° C. Die kleinere Vorlage wird in ein besonderes Becherglas entleert und mit dem zehnfachen Volumen Wasser verdünnt; tritt hierbei Trübung ein, so wird der Inhalt mit dem der ersten Vorlage vereint. Die gefundene Menge Silberjodid, mit 0,3922 multipliziert, ergibt die vorhandene Glyzerinmenge.

Die Silberlösung erhält man, indem man 40 g geschmolzenes Silbernitrat in 100 ccm Wasser löst, mit absolutem Alkohol zum Liter auffüllt und nach 24stündigem Stehen filtriert.

Der rote Phosphor muß durch Waschen mit Schwefelkohlenstoff, Äther, Alkohol und Wasser gereinigt werden. Zu je einer Füllung des Blasen-zählers genügen etwa 0,5 g, die für viele Bestimmungen ausreichen.

Es dürfen keine Alkohole, Ester und Äther vorhanden sein, da sie mit Jodwasserstoff flüchtige Jodide liefern; ebenso störend wirken Schwefelverbindungen, die Schwefelwasserstoff und Isopropylmerkaptan bilden, und müssen, soweit dies ausführbar ist, vorher entfernt werden.

In Fetten bestimmt Fanto¹⁾ das Glyzerin in der Weise, daß er 10 g Fett mit 80—100 ccm $\frac{1}{2}$ normaler alkoholischer Kalilauge verseift, das Gemisch mit 100 ccm Wasser versetzt und die Fettsäuren durch konzentrierte Essigsäure abscheidet, worauf der Alkohol größtenteils verdampft wird, wobei die Flüssigkeit nicht unter 50 ccm verringert werden darf. Nun läßt man die Fettsäuren erstarren, eventuell unter Zusatz von Hartparaffin und filtriert die Flüssigkeit in einen Kolben, der zwischen 60 und 70 ccm mit einer Marke versehen ist. Die Fettsäuren schmilzt man wiederholt mit je 15—20 ccm Wasser, dampft die gesammelte wässerige Flüssigkeit auf 60—70 ccm ein, spült sie in einen 100 ccm fassenden Kolben über und behandelt 5 ccm nach dem Jodidverfahren.

9. Monoglyzeride und Diglyzeride.

Die Bestimmung der Diglyzeride in Ölen und Fetten gründet sich auf die Eigenschaft derselben, beim Kochen mit Essigsäureanhydrid eine Azetylgruppe aufzunehmen und in Triglyzeride überzugehen, wie folgende Gleichung zeigt:



¹⁾ Neues Verfahren zur Bestimmung des Glyzerins. Zeitschr. landw. Vers.-Wes. Österr. 4, 977 und 5, 729. Fanto, Glyzerinbestimmung in Fetten. Zeitschr. f. angew. Chem. 17, 420.

Das zu untersuchende Fett wird durch Kochen mit Essigsäureanhydrid wie gewöhnlich azetyliert, das Gemisch in ein hohes Becherglas quantitativ übergespült und eine halbe Stunde gekocht. Hierauf filtriert man durch ein vorher bei 100° C getrocknetes und gewogenes Filter, das man vorher mit heißem Wasser füllt, wäscht das azetylierte Fett auf dem Filter mit kochendem Wasser bis zum Verschwinden der sauren Reaktion und trocknet bei 100° C bis zur annähernden Gewichtskonstanz (s. Hehnersche Zahl). Die Gewichtszunahme wird auf 1 g des angewandten Fettes berechnet.

Ist M das Molekulargewicht des Diglyzerides, dessen Natur als bekannt vorausgesetzt wird, so bilden sich bei der Azetylierung aus M Teilen Diglyzerid $M + 42$ Teile (Molekulargewicht der Gruppe C_2H_2O) Triglyzerid und 1 g reines Diglyzerid nimmt um $\frac{42}{M}$ zu. Be trägt die Gewichtszunahme pro 1 g angewandter Substanz a Gramm, so entsprechen derselben $a \cdot \frac{42}{M}$ Gramm Diglyzerid und der Prozentgehalt des Diglyzerids in der Probe:

$$D = \frac{100 \cdot M \cdot a}{42}.$$

Liegt ein reines Diglyzerid vor, so kann dessen Molekulargewicht aus der Gewichtszunahme berechnet werden nach folgender Proportion:

$$b : b + a = M : M + 42; \quad b(M + 42) = M(b + a); \quad M = \frac{42 \cdot b}{a},$$

worin b das Gewicht des angewandten Diglyzerides, a die Gewichtszunahme, M das Molekulargewicht des Diglyzerides und 42 das Molekulargewicht der Gruppe C_2H_2O bedeutet.

10. Bestimmung des Unverseifbaren.

Fast alle tierischen und pflanzlichen Fette und Öle enthalten im natürlichen Zustande geringe Mengen Cholesterin resp. Phytosterin und außerdem Körper, deren Natur noch nicht aufgeklärt ist. Verseift man ein Fett oder Öl in gewöhnlicher Weise, versetzt die Seife mit Wasser und verjagt den Alkohol durch Erwärmen auf dem Wasserbade, so geht die Seife in Lösung über, während sich an der Oberfläche der Flüssigkeit eine Substanz ausscheidet, die man als „Unverseifbares“ bezeichnet. Unter Unverseifbarem sind also alle diejenigen Substanzen zu verstehen, die der Wirkung des Alkali beim Verseifungsprozeß widerstehen und den in Wasser unlöslichen Teil bilden.

Die Trennung des unverseifbaren Teiles von der Seife geschieht entweder durch direkte Wägung oder durch Extraktion des Unverseifbaren, wobei man die Seifenlösung oder die trockene Seife extrahieren kann. Die Extraktionsmethoden beruhen auf der leichten Löslichkeit des Unverseifbaren in Äther, Petroleumäther und anderen organischen Lösungsmitteln.

a) Direkte Wägung.

Die Verseifung des zu untersuchenden Fettes oder Öles wird in einem Kochkolben bewirkt, die Seife mit Wasser versetzt, erhitzt und dann so viel Wasser hinzugegossen, daß die Flüssigkeit bis in den langen Hals des Kolbens hineinreicht und einige Zeit in der Wärme stehen gelassen. Das Unverseifbare sammelt sich auf der Oberfläche der Flüssigkeit und wird abgegossen oder mit einer Pipette abgehoben und gewogen. Zur Kontrolle kann man nochmals mit Natronlauge kochen und prüfen, ob Gewichtsverlust eintritt. War nicht genug Wasser zur Lösung der Seife vorhanden, so steigt auch diese an die Oberfläche der Flüssigkeit und das unverseifte Öl sondert sich nicht gut ab. In diesem Falle gießt man in einen größeren Kolben über, fügt genügend Wasser hinzu und verfährt wie oben (E. Geissler).

b) Extraktion der Seifenlösung.

Das Verfahren von Allen und Thomson ¹⁾ besteht darin, daß man 5 g des zu untersuchenden Fettes mit 25 ccm alkoholischer Natronlauge (80 g Ätznatron im Liter enthaltend) in einer Porzellanschale bis zur Trockne eindampft, die Seife in 50 ccm heißem Wasser löst und die Lösung in einen etwa 200 ccm fassenden Scheidetrichter bringt, wobei man die Schale mit 20—30 ccm Wasser nachspült. Man läßt erkalten, schüttelt mit 30—50 ccm Äther gut durch, wobei man zur besseren Trennung der beiden Schichten etwas Alkohol zusetzt, läßt hierauf die Seifenlösung abfließen und schüttelt noch zwei- bis dreimal mit frischem Äther aus. Die vereinigten Ätherauszüge werden mit etwas Wasser gewaschen, der Äther auf dem Wasserbade verdunstet und der Rückstand getrocknet und gewogen.

F. Nitsche ²⁾ erhitzt 10 g Fett mit 7 g Natronlauge von 38° B und 30 g 90—96prozentigem Alkohol im Wasserbade bis zum beginnenden Sieden des Alkohols und fügt langsam 40 g Glycerin von 28° B hinzu. Die Seifenlösung wird dann mit reinem rückstandsfreiem Benzin kräftig durchgeschüttelt, wobei die Kohlenwasserstoffe vom Benzin aufgenommen werden und sich von der Seifenlösung leicht und vollständig trennen. Nach dem Verdunsten des Benzins bleiben die Kohlenwasserstoffe zurück.

c) Extraktion der trockenen Seife.

Da Äther beim Extrahieren der trockenen Seife bedeutend größere Mengen Seife aufnimmt als beim Ausschütteln wässriger Seifenlösungen, so empfiehlt sich hier, Petroleumäther, Chloroform oder Azeton anzuwenden.

Die von Allen und Thomson bei der Untersuchung verschiedener Fette angewandte Methode besteht darin, daß man 10 g Fett in einer

¹⁾ Allen und Thomson, Chem. News **43**, 267.

²⁾ F. Nitsche, Nachweis von Kohlenwasserstoff in Fetten. Seifenfabrikant **1883**, 565.

Porzellanschale von etwa 13 cm Durchmesser mit 50 ccm 8prozentiger, alkoholischer Natronlauge unter fortwährendem Umrühren auf dem Wasserbade erhitzt, bis die Seife zu schäumen beginnt, setzt 15 ccm Methylalkohol zu und erhitzt weiter bis zur vollständigen Lösung der Seife. Hierauf trägt man in die Lösung in kleinen Portionen unter Umrühren 5 g Natriumbikarbonat ein, wodurch der Überschuß an Natriumhydrat in Karbonat übergeführt wird, setzt 50—70 g ge-
glühten Seesand hinzu, trocknet 20 Minuten auf dem Wasserbade und extrahiert die Masse im Soxhletapparat mit Petroleumäther vom Siedepunkt 60° C. Ist die Masse erschöpft, so wird der Petroleumäther verjagt und der Rückstand getrocknet und gewogen.

G. Halphen ¹⁾ verfährt bei der Bestimmung des Unverseifbaren in der Weise, daß er 5—10 g Substanz in dem zehnfachen Volumen Schwefelkohlenstoff löst, dann tropfenweise unter stetem Umschütteln mit dem doppelten Volumen konzentrierter Schwefelsäure (66°) versetzt, wobei er die Temperatur unter 25° C hält. Hierauf wird das Gemisch in den Scheidetrichter gebracht, die untere Schicht abgezogen, die obere mit etwas Tierkohle geschüttelt, filtriert, der Schwefelkohlenstoff abdestilliert und der Rückstand nach dem Trocknen gewogen. Bei Gegenwart schwerer Mineralöle erhält man niedrige Werte, etwa 2—5 Proz. vom Gesamtgewicht des Unverseifbaren, da diese durch Schwefelsäure schwer angegriffen werden.

Im Wachs bestimmt man das Paraffin, indem man den Chloroformrückstand mit Essigsäureanhydrid kocht, wobei Myrizylalkohol als Ester in Lösung geht, und filtriert heiß unter Anwendung eines Heißwassertrichters. Das Filter muß immer feucht bleiben, weil das geschmolzene Paraffin leicht durch die Poren des Papiers dringt. Das Paraffin wird auf dem Filter zuerst mit siedendem Essigsäureanhydrid, dann mit siedendem Wasser gewaschen und samt Filter in einem Becherglas bei 100° C getrocknet, in Petroleumäther oder Chloroform gelöst, filtriert und nach dem Verdunsten des Lösungsmittels gewogen. Die Bestimmung des Paraffins gelingt vollständig, wenn dem Wachs auch Harz beigemengt ist.

VII. Qualitative Prüfung der Fette und Öle.

1. Elaidinreaktion.

Schüttelt man Olivenöl mit einer Lösung von Quecksilber in salpetrige Säure enthaltender Salpetersäure, so erstarrt es nach den Beobachtungen von Poutet und Boudet unter Bildung einer vom letzteren genannten Elaidinsäure. Das flüssige Olein geht in Gegenwart von salpetriger Säure in das feste Elaidin über, während die Glyzeride der stärker ungesättigten Fettsäuren, wie Linsäure, Linolensäure und Isolinolensäure unverändert bleiben. Daher liefern die nicht trocknenden Öle feste Massen, die trocknenden Öle bleiben mehr oder weniger flüssig.

Das von Poutet angegebene Verfahren wird in folgender Weise ausgeführt:

10 g Öl, 5 g Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,38—1,41 und 1 g

¹⁾ G. Halphen, Ann. Chim. anal. appl. 6, 133.

Quecksilber werden in einem Reagenzglas stark geschüttelt, bis sich das Quecksilber vollständig löst; man läßt die Lösung dann 24 Stunden stehen. Das Erstarren des Öles tritt oft bedeutend schneller ein.

Die Vorschrift von Archbutt besteht darin, daß man 18 g Quecksilber in einen Stöpselzylinder von 50 ccm Inhalt bringt, 15,6 ccm Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,42 zufließen läßt, wobei die Lösung sich grün färbt. 8 g dieser Lösung schüttelt man in einer weithalsigen Stöpselflasche mit 96 g des zu prüfenden Öles gut durch und stellt sie in Wasser von 25° C, wobei die Temperatur konstant erhalten werden muß. Man schüttelt während 2 Stunden in Intervallen von 10 Minuten gut durch und beobachtet die Zeit, in der die Masse starr wird. Die härtesten Massen bilden Olivenöl, Arachisöl, Mandelöl, Schmalzöl, Walratöl.

2. Chlorschwefelreaktion.

Rohleder¹⁾ machte die Beobachtung, daß, wenn man Chlorschwefel tropfenweise in Olivenöl gießt, dieses zu einer gelben durchsichtigen Gallerte erstarrt, die sich weder in Äther, noch in Alkohol und Wasser verändert, nur etwas durchsichtiger und dabei so elastisch wird, wie Kautschuk bei gewöhnlicher Temperatur.

Russin²⁾ fand, daß, wenn man zu einem Teil eines Pflanzenöles den 30. Teil Chlorschwefel hinzufügt, sich letzterer vollständig auflöst, wobei das Gemisch sich in kurzer Zeit erhitzt und so klebrig wird, daß man das Glas umkehren kann, ohne daß dessen Inhalt ausläuft. Setzt man den 10. Teil Chlorschwefel vom Volumen des Öles zu, so erwärmt sich das Gemisch bald auf 50 bis 60° C, es entwickelt sich salzsaures Gas und die Masse erstarrt plötzlich, ohne ihre Durchsichtigkeit zu verlieren und bekommt eine dem Kautschuk ähnliche Konsistenz. Diese Masse verliert in destilliertem Wasser ihre Durchsichtigkeit und wird weiß; nach einigen Tagen läßt sich die Masse leicht zerreiben. Mischt man einen Teil Schwefelchlorür und 9 Teile Öl und erhitzt das Gemisch sofort, so entwickelt sich bei etwa 60° C salzsaures Gas und die ganze Masse verwandelt sich in ein elastisches, schwammartiges Produkt.

Diese Produkte werden auch von kochenden, konzentrierten Alkalien nicht angegriffen, ebenfalls indifferent verhalten sie sich gegen Ammoniak und verdünnte Säuren. In Wasser, Alkohol, Äther, Schwefelkohlenstoff und in Ölen sind sie unlöslich und unveränderlich.

3. Hexabromidprobe.

Hehner und Mitchell³⁾ benutzen die Eigenschaft der ungesättigten Fettsäuren der Öle sowie der Öle selbst, mit Brom unlösliche Niederschläge, Hexabromide, zu liefern, um die trocknenden von den halbtrocknenden Ölen zu unterscheiden.

Die Bromierung der Fettsäuren führt man in folgender Weise aus. Man löst 0,2—0,3 g der zu prüfenden Fettsäuren in 10 ccm Essigsäure, kühlt in verkorkter Flasche auf 5° C ab und fügt tropfenweise Brom zu, bis die Bromfarbe stehen bleibt und läßt 3 Stunden stehen. Hierauf filtriert man durch ein Soxhletasbestrohr ab, wäscht mit gekühlter Essigsäure, Alkohol und Äther in Portionen von je 5 ccm sukzessive aus und trocknet den weißen Rückstand im Wassertrockenschrank bis zur Gewichtskonstanz. Zweckmäßiger bestimmt man noch den Gehalt an Brom in dem Niederschlag und berechnet daraus das Hexabromid.

Bedeutet m den gefundenen Bromgehalt in Prozenten, x den gesuchten Hexabromidgehalt in Prozenten, 63,3 und 53,3 die prozentischen Bromgehalte des Hexa- und Tetrabromids, so ist

$$m = \frac{63,3 \cdot x}{100} + \frac{(100-x) \cdot 53,3}{100}$$

$$\text{oder } 10 \cdot x = 100 (m \times 53,3), \text{ oder } x = \frac{100 (m \times 53,3)}{10}$$

¹⁾ Rohleder, Dingl. polyt. Journ. **111**, 159 (1849).

²⁾ Russin, Über die Wirkung des Schwefelchlorürs auf die Öle. Dingl. polyt. Journ. **151**, 136 (1859).

³⁾ Hehner und Mitchell, Beitrag zur Chemie der trocknenden Öle Analyst. **23**, 310.

Die Bromierung der Öle läßt sich viel leichter ausführen. Man löst 1 bis 2 g Öl in 40 ccm Äther, fügt etwas Eisessig hinzu, kühlt die Lösung in einem mit Eis gefüllten Gefäß ab, setzt Brom zu und läßt über Nacht im Eis stehen. Man saugt dann den Niederschlag ab, wäscht viermal mit je 10 ccm Äther von 0° C nach und trocknet im Kölbchen bis zur Gewichtskonstanz.

4. Thermale Reaktionen.

a) Temperaturerhöhung mit konzentrierter Schwefelsäure.

Die Eigenschaft der trocknenden Öle, sich beim Vermischen mit konzentrierter Schwefelsäure stärker zu erwärmen, als nichttrocknende, schlug Maumené als charakteristische Reaktion „thermometrische Ölprobe bei der Untersuchung der Fette und Öle anzuwenden, vor. Die Versuche haben ergeben, daß man vergleichbare Resultate erzielen kann, wenn man stets unter denselben Bedingungen arbeitet, d. h. wenn man Schwefelsäure von genau derselben Konzentration anwendet, sie sorgfältig vor Luftzutritt schützt, ferner wenn man die Bestimmungen bei derselben Temperatur und sogar in denselben Gefäßen ausführt. Die Maumenéschen Versuche haben ferner ergeben, daß, wenn man Schwefelsäure auf 320° C erhitzt und sofort nach dem Erkalten anwendet, eine andere Temperaturerhöhung eintritt, als bei nicht erhitzter Säure.

b) Temperaturerhöhung beim Vermischen mit Chlorschwefel.

A. Fawsitt versuchte, die Schwefelsäure beim Maumenéschen Verfahren durch Chlorschwefel zu ersetzen. Die Messung der durch Einwirkung von Chlorschwefel S_2Cl_2 auf Öle entwickelten Wärme führte jedoch nicht zu besseren Resultaten, als nach den anderen Methoden. Fawsitt¹⁾ untersuchte eine ganze Reihe von Ölen und beobachtete dabei die Temperaturerhöhung, die hierzu nötige Zeit, die Konsistenz- und Farbenveränderung, die Gasentwicklung usw. Die Probe wird in der Weise ausgeführt, daß man 30 g des zu prüfenden Öles in einem kleinen Becherglas, das sich in einem größeren, mit Watte ausgefüllten Gefäß befindet, langsam mit Chlorschwefel unter fortwährendem Umrühren mit dem Thermometer versetzt und die Zeit sowie die höchste bei der Reaktion auftretende Temperatur notiert.

c) Temperaturerhöhung beim Bromieren der Öle.

Die Eigenschaft der Öle, beim Vermischen mit Brom eine Temperaturerhöhung zu zeigen, benutzten O. Hehner und C. Mitchell²⁾ als charakteristische Reaktion bei der Untersuchung der Öle. Die Reaktion verläuft augenblicklich und mit einer sehr großen Wärmeentwicklung. Um die Reaktion zu mäßigen, wird das zu untersuchende Öl in Chloroform oder Essigsäure, nach Gill und Hatch in Tetrachlorkohlenstoff gelöst. Hehner und Mitchell verfahren in der Weise, daß sie in einem Dewarschen Vakuumprobierrohr, bei dem Wärmeverluste ausgeschlossen sind, 1 g Fett in 10 ccm Chloroform lösen und mit genau 1 ccm Brom versetzen; die Temperaturerhöhung wird an einem in Zehntelgrade geteilten Thermometer beobachtet. Multipliziert man die Temperaturerhöhung mit 5,5, so erhält man bei den meisten Fetten Werte, die den Hüblschen Jodzahlen sehr nahekommen. Größere Differenzen fanden sie nur bei Rüböl und Leinöl.

5. Sauerstoffabsorption.

Die Eigenschaft mancher Öle, sich in eine feste Substanz zu verwandeln, wenn sie der Wirkung der Luft bei gewöhnlicher Temperatur ausgesetzt sind,

¹⁾ A. Fawsitt, Einwirkung von Chlorschwefel auf Öle. Journ. Soc. Chem. Ind. 1888, 552.

²⁾ O. Hehner und C. Mitchell, Eine neue therm. Probe zur Prüfung der Fette. Analyst. 20, 146.

dient als Kennzeichen der sogenannten trocknenden Öle, wie Leinöl, zum Unterschied von nichttrocknenden Ölen, die unter denselben Bedingungen unverändert bleiben, wie z. B. Olivenöl. Die Trockenfähigkeit eines Öles wird durch die Sauerstoffaufnahme bedingt, die um so intensiver ist, je mehr ein fettes Öl an Glyzeriden der ungesättigten Fettsäuren enthält und je stärker ungesättigt diese Fettsäuren sind.

VIII. Untersuchung der Fettsäuren.

1. Freie Fettsäuren, Neutralfett und mittleres Molekulargewicht der Fettsäuren.

Aus der Säurezahl läßt sich nach Hansamann der Gehalt F eines Fettes an freien Fettsäuren berechnen, sobald man das mittlere Molekulargewicht m der freien Fettsäuren kennt, in folgender Weise:

$$56,1 : m = \frac{S}{10} : F, \quad F = \frac{ms}{561} \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot 1$$

Um das mittlere Molekulargewicht der freien Fettsäuren zu bestimmen, verfährt Hansamann ¹⁾ in der Weise, daß er 5 g der Probe in Alkohol löst und unter Zusatz von 2—3 Tropfen alkoholischer Phenolphthaleinlösung mit alkoholischer Normalkalilauge neutralisiert. Eine andere Probe wird mit 25 ccm alkoholischer Normalkalilauge versetzt, auf dem Wasserbade bis zur vollständigen Auflösung erwärmt, wobei eine Verseifung des Neutralfettes und der Fettsäure zugleich stattfindet; dann wird der Überschuß an Alkali zurücktitriert.

Besteht das untersuchte Fettsäuregemisch aus Palmitin-, Stearin-, und Oleinsäure mit den Molekulargewichten 256, 284 und 282, sind ferner zum Verseifen von 5 g des Fettsäuregemenges 18,3 ccm Normalkalilauge verbraucht worden, so sind 1000 ccm Normalkali = $(5000 : 18,3) = 273,2$ g des Fettsäuregemenges, daher ist 273,2 das Molekulargewicht der Mischung. Sind ferner zur Neutralisation von 5 g der Probe 17 ccm Normalalkali verbraucht worden, so enthält die Probe $17 \times 0,2723 = 4,644$ g = 92,8 Proz. Fettsäure und 7,2 Proz. Neutralfett.

Gröger ²⁾ gibt folgendes Verfahren zur Trennung von Fettsäuren und Neutralfett; 4—8 g des Säuregemenges werden in einem etwa 300 ccm fassenden Kolben in 50 ccm 96prozentigem Alkohol unter Erwärmen gelöst, die Lösung nach Zusatz von einigen Tropfen Phenolphthaleinlösung bis zur bleibenden Rotfärbung titriert und mit 150 ccm Wasser verdünnt, wodurch sich das Neutralfett ausscheidet. Das Neutralfett schüttelt man mit 60—100 ccm Äther aus, läßt absetzen und pipettiert den größten Teil der klaren Seifenlösung aus dem Kölbchen vorsichtig ab, verdünnt sie stark mit Wasser und kocht so lange, bis der Äther und Alkohol vollständig verdunsten. Nun setzt man durch ver-

¹⁾ Hansamann, Die Bestimmung unzersetzten Fettes in Fettsäuregemengen. Dingl. Polyt. Journ. **240**, 62 (1881).

²⁾ Gröger, Die Bestimmung von Neutralfett in Fettsäuregemengen. Dingl. Polyt. Journ. **244**, 303 (1882).

dünnte Schwefelsäure oder Salzsäure die Fettsäuren in Freiheit, wäscht sie mit heißem Wasser bis zum Verschwinden der sauren Reaktion nach und läßt erkalten. Erstarren die Fettsäuren zu einem Kuchen, so hebt man diese ab, ohne die an den Wänden haftenden Teile zu beachten; bleiben die Fettsäuren flüssig, so pipettiert man den größten Teil derselben ab. Hierauf titriert man die in Alkohol gelösten, vorher sorgfältig getrockneten Fettsäuren mit $\frac{1}{2}$ normalalkoholischer Kalilauge. Die Anzahl der zur Neutralisation der freien Fettsäuren verbrauchten Kubikzentimeter Normalkalihydrat mit dem 1000. Teil der so gefundenen Verseifungszahl n multipliziert, ergibt das Gewicht der darin enthaltenen Fettsäuren, somit auch die Menge des Neutralfettes:

$$m : 56,1 = 1000 : n; \quad m = \frac{56100}{n} \dots\dots\dots 2.$$

Substituiert man diesen Ausdruck in die Gleichung 1, so erhält man

$$F = \frac{100 s}{n} \dots\dots\dots 3.$$

Da es nur auf das Verhältnis von s zu n ankommt, ist es gar nicht notwendig, die Säurezahl des Fettes und die Verseifungszahl n der freien Fettsäuren auszurechnen, sondern es kann statt dessen die für je 1 g des Fettes und der Fettsäuren verbrauchte Anzahl Kubikzentimeter a und b eingesetzt werden, wobei auch der Titer der Kalilauge nicht bekannt zu sein braucht. Es ist dann

$$F = \frac{100 a}{b}$$

2. Laktone.

Die Bestimmung der Laktone in Fetten oder Fettsäuregemischen erfolgt maßanalytisch oder gewichtsanalytisch.

Man zieht aber gewöhnlich die gewichtsanalytische Methode vor, da die Zusammensetzung der Laktone nur selten bekannt ist.

Man verseift 10–100 g des Fettes oder Fettsäuregemisches mit überschüssiger alkoholischer Kalilauge, verdünnt mit etwas Wasser und schüttelt mehrmals mit Petroleumäther aus, um die unverseifbaren Bestandteile zu entfernen. Die so erhaltene Seifenlösung wird mit heißem Wasser verdünnt, mit Salzsäure angesäuert und auf dem Wasserbade erwärmt, bis der Alkohol vollständig verdunstet. Die aufschwimmende Fettschicht hebt man ab, wäscht mit Wasser aus und neutralisiert genau mit Natronlauge, was in folgender Weise geschieht: Man löst die Fettmasse in Alkohol, pipettiert davon 50 ccm ab und versetzt unter Zusatz von Phenolphthalein aus einer Burette mit Natronlauge bis zum Eintreten der Rotfärbung. Aus der für 50 ccm verbrauchten Anzahl Kubikzentimeter Natronlauge berechnet man die für die übrigen 450 ccm notwendige Menge Natronlauge, fügt den größten Teil derselben auf einmal zu und titriert tropfenweise zu Ende. Hierauf

wird die Flüssigkeit mit Petroleumäther ausgeschüttelt, der Äther verdunstet, der Rückstand getrocknet und gewogen (Benedict)¹⁾.

3. Flüchtige und lösliche Fettsäuren.

Die flüchtigen und löslichen Fettsäuren sind in den meisten Fällen identisch. Eine Ausnahme bilden die Fette der Kokosnußölgruppe, bei denen die flüchtigen Fettsäuren in Wasser so gut wie unlöslich sind, während die flüchtigen Fettsäuren des Butterfettes zu etwa 90 Proz. in Wasser leicht löslich sind. Ferner ist im Japanwachs eine nichtflüchtige, wasserlösliche Säure, die zweibasische Japansäure nachgewiesen.

Da man nach der Reichert-Meißl'schen Methode nur einen Teil der in einem Fette enthaltenen flüchtigen Fettsäuren ermittelt, so verfährt man zur Bestimmung der Gesamtmenge flüchtiger Fettsäuren in der Weise, daß man etwa 5 g Fett mit 60 ccm $\frac{1}{2}$ normaler alkoholischer Kalilauge verseift, den Überschuß an Kalihydrat dann mit $\frac{1}{2}$ normaler Salzsäure zurücktitriert und auf solche Weise die Verseifungszahl feststellt. Hierauf dampft man den Alkohol ab, löst die Seifen in Wasser und versetzt die wässrige Seifenlösung mit Salzsäure, wodurch die Fettsäuren ausfallen, die man dann auf dem Filter sammelt und mit heißem Wasser auswäscht (s. Hehnerzahl). Die unlöslichen Fettsäuren löst man in Alkohol, titriert mit $\frac{1}{2}$ normaler Kalilauge, um die Neutralisationszahl festzustellen. Zieht man nun die so ermittelte Neutralisationszahl von der Verseifungszahl ab, so erhält man eine Zahl, die angibt, wieviel Kalihydrat zur Neutralisation der flüchtigen Fettsäuren erforderlich ist.

Beispiel. Für die Verseifung von 5 g Butterfett seien 1130 mg KOH verbraucht worden, für die Neutralisation der unlöslichen Fettsäuren 920 mg. Die Differenz $1130 - 920 = 210$ entspricht der für die Neutralisation der löslichen Fettsäuren in 5 g Butterfett nötigen Menge Alkali. Es sind also pro Gramm Butterfett 42 mg KOH verbraucht worden.

4. Trennung der gesättigten von den ungesättigten sowie der flüssigen und festen Fettsäuren.

Die Anwesenheit von flüssigen, ungesättigten Fettsäuren in einem festen Fette weist man durch die Bestimmung der Jodzahl nach. Wird kein Jod absorbiert, so enthält das Fett keine flüssigen ungesättigten Fettsäuren. In einem flüssigen Fett weist man feste Fettsäuren nach, indem man das Fett mit alkoholischer Kalilauge verseift, mit Essigsäure neutralisiert, unter Anwendung von Phenolphthalein als Indikator das Filtrat dann mit 2 Teilen Äther und alkoholischer Bleiazetatslösung versetzt, wodurch ein weißer Niederschlag von festen Fettsäuren entsteht.

Die quantitative Trennung der festen von den flüssigen Fettsäuren beruht auf der Eigenschaft der Bleisalze der flüssigen Fettsäuren (Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure usw.) sich in Äther zu lösen, während die Bleisalze der festen Fettsäuren (Palmitinsäure, Stearinsäure usw.) darin fast unlöslich sind. Mulder zeigte aber,

¹⁾ Benedict, Monatshefte f. Chemie 11, 71.

daß die auf dieser Eigenschaft gegründete Methode von Varrentrap keine streng genauen Resultate liefert, da einerseits geringe Mengen der festen Säuren vom Äther aufgenommen werden, andererseits die Bleisalze der ungesättigten Fettsäuren teilweise ungelöst bleiben.

Man erhitzt im Wasserbade 3 g der Probe mit 50 ccm Alkohol und einem Stück Kalihydrat bis zur Verseifung, fügt ein paar Tropfen Phenolphthaleinlösung und Essigsäure bis zur schwachsauren Reaktion



Fig. 18.
Ölbürette nach
J. Muter und
L. de Koningh.¹⁾

und hierauf alkoholische Kalilauge bis zum Eintritt der Rotfärbung hinzu. Man bringt diese Lösung unter fortwährendem Umrühren in eine bis zum Kochen erhitzte Mischung von 30 ccm 10prozentiger Bleiazetatlösung und 200 ccm Wasser, kühlt rasch ab, hebert die über dem Niederschlag stehende klare Flüssigkeit ab, wäscht den Niederschlag mit heißem Wasser aus und läßt die so erhaltene Bleiseife in verschließbarer Flasche mit etwa 120 ccm absolutem Äther unter öfterem Umschütteln 12 Stunden stehen, wobei die Seife in Lösung geht. Diese Lösung filtriert man dann in die Ölbürette (Fig. 18), wäscht bis zum Verschwinden der Bleireaktion mit Äther nach, spült bis zur Marke 250 ccm mit verdünnter Salzsäure (1 : 4) nach und schüttelt bis zur vollständigen Klärung der ätherischen Schicht. Nach dem Absetzen läßt man die wässrige Schicht ab, gießt bis zur Marke Wasser auf und wäscht bis zum Verschwinden der sauren Reaktion, worauf man durch Zusatz von Wasser den unteren Meniskus des Äthers auf 0 stellt. Durch Zusatz von Äther bringt man das Volumen auf 20 ccm, schüttelt durch, läßt einen aliquoten Teil in einen Erlenmeyerschen Kolben fließen, destilliert den Äther zum größten Teil ab, setzt 50 ccm Alkohol und 1 Tropfen Phenolphthalein zu und titriert mit $\frac{1}{10}$ Normalsoda. 1 ccm entspricht 0,0282 g Ölsäure.

Die Jodzahl bestimmt man, indem man in 50 ccm der ätherischen Lösung unter Erwärmen auf dem Wasserbade auf 50° einen Strom reiner trockner Kohlensäure durchleitet, wodurch der Äther verjagt wird und verfährt weiter nach Hübl.

Die Jodzahl bestimmt man, indem man in 50 ccm der ätherischen Lösung unter Erwärmen auf dem Wasserbade auf 50° einen Strom reiner trockner Kohlensäure durchleitet, wodurch der Äther verjagt wird und verfährt weiter nach Hübl.

Um die Filtration des unlöslichen Bleistearats zu erleichtern, empfiehlt N. Laue²⁾, die Bleiseifen in einem Erlenmeyerkolben zu fällen und unter fortwährendem Umschwenken in fließendem Wasser zu kühlen, wodurch der Niederschlag an den Wänden haften bleibt und auf solche Weise leichter durch Dekantation gewaschen werden kann. Hierauf kocht man mit Äther am Rückflußkühler und läßt vollständig erkalten, damit sich das Bleistearat ausscheidet.

¹⁾ Um den verschiedenen Ungenauigkeiten aus dem Wege zu gehen, schlagen J. Muter und L. de Koningh, eine Modifikation vor, nach der die Wägung der Bleisalze, sowie die Bestimmung des Bleies überflüssig ist, Analyst 14 (1886).

²⁾ N. Laue, Untersuchungsmethode zur Analyse von Fetten und Ölen. Journ. Amer. Chem. Soc. 15, 110 (1893).

Die unlöslichen Bleisalze verwandeln sich beim Kochen in ein Pulver, das sich leichter abfiltrieren und waschen läßt.

Die von K. Farnsteiner ausgearbeitete Modifikation besteht im wesentlichen in der Anwendung des Benzols als Lösungsmittel, in dem die Bleisalze der festen Fettsäuren bei einer Temperatur unterhalb 8—12° C unlöslich sind, während sich die Bleisalze der flüssigen Fettsäuren leicht lösen.

Man löst die aus 1 g Fett gewonnenen Bleisalze in 50 ccm warmem Benzol, läßt die Lösung bei Zimmertemperatur $\frac{1}{4}$ Stunde stehen und kühlt dann die Flüssigkeit während 2 Stunden auf 8—12° ab. Hierauf verschließt man die Kolbenöffnung mit einem doppelt durchbohrten Stopfen, durch dessen Öffnungen ein 10 cm langes Rohr und ein zweites bis auf den Boden reichendes, außerhalb des Kolbens durch zwei rechtwinklige Biegungen nach unten geführtes Rohr geht. Die untere Mündung des im Kolben befindlichen Teiles des zweiten Rohres ist mit einem glatt geschnittenen Pfropfen von fettfreier Watte versehen. Man bläst durch das kurze Glasrohr in den Kolben und drückt dadurch die Flüssigkeit aus dem Kolben heraus, spült die Mündung des Filterrohres mit Benzol aus, wäscht den Niederschlag mit 10 ccm auf 10° C abgekühltem Benzol und drückt die Flüssigkeit in gleicher Weise über. Nun löst man den Niederschlag durch Erwärmen in Benzol auf, wobei man das Filterrohr etwas herauszieht, so daß das Filter über der Flüssigkeit steht, läßt 1 Stunde lang bei 8—12° C stehen und filtriert wie oben angegeben. Diese Manipulation führt man zum drittenmal aus, so daß im ganzen etwa 120—130 ccm einer die flüssigen Fettsäuren enthaltenen Lösung resultiert.

Lewkowitsch hat aus den von Farnsteiner ausgeführten Versuchen berechnet, daß in einzelnen Fällen die Verluste 5,8 bis 9,6 Proz. betragen, während die Varrentrapsche Methode Verluste von etwa 3 Proz. gibt. Bei Anwendung größerer Mengen von Fettsäuren könnte man vielleicht auch nach der Farnsteinerschen Modifikation bessere Resultate erhalten.

Die Methode von Tortelli und Ruggeri ¹⁾ gestattet eine genaue Bestimmung der ungesättigten Fettsäuren. Man verfährt in der Weise, daß man 20 g Substanz mit 30 ccm einer 60prozentigen alkoholischen Kalilauge auf dem Wasserbade verseift und unter Zusatz von Phenolphthalein mit 10prozentiger Essigsäure genau neutralisiert. Die neutralisierte Lösung gießt man dann in dünnem Strahle in 300 ccm einer zum Sieden erhitzten neutralen 10prozentigen Bleiazetatlösung. Nach dem Erkalten gießt man die klare Flüssigkeit ab und wäscht die Seife dreimal mit je 200 ccm Wasser von 60—70° C aus. Hierauf läßt man die Seife erkalten, trocknet sie mit Filtrierpapier, setzt etwa 200 ccm Äther zu und erhitzt 20 Minuten am Rückflußkühler. Die Bleiseifen der festen Fettsäuren scheiden sich beim Erkalten in Form eines Pulvers aus und die ätherische Lösung läßt sich gut abfiltrieren.

¹⁾ Tortelli und Ruggeri, L'Orosi **21**, 37.

Die ätherische Lösung wird mehrmals mit Salzsäure und dann mit Wasser gewaschen, der Äther bis auf 40—50 ccm abdestilliert und der Rest im Kohlensäurestrom auf dem Wasserbade erwärmt, bis der Äther vollständig verdunstet. In den so erhaltenen Fettsäuren wird die Jodzahl bestimmt.

Partheil und Férié¹⁾ benutzen zur Trennung der gesättigten von den ungesättigten Säuren die verschiedene Löslichkeit von deren Lithiumsalzen. Etwa 1 g Fett wird mit 15 ccm halbnormaler alkoholischer Kalilauge auf dem Wasserbade verseift und die Seife in 100 ccm 50prozentigem Alkohol gelöst. Der Alkaliüberschuß wird unter Zusatz von Phenolphthalein mit verdünnter Essigsäure neutralisiert, die Lösung dann mit einer 10prozentigen Lösung von Lithiumazetat in 50prozentigem Alkohol versetzt, wodurch die höheren festen Fettsäuren ausfallen. Die Mischung wird auf dem Wasserbade auf etwa 60° C erwärmt, wobei der Niederschlag wieder in Lösung geht. Beim Erkalten scheiden sich das palmitinsäure, stearinsäure und der größte Teil des myristinsäuren Lithiums kristallinisch aus. Die ausgeschiedenen Salze löst man in 100 ccm heißem absolutem Alkohol, läßt erkalten, wobei sich das palmitinsäure und stearinsäure Lithium ausscheiden, die man filtriert, trocknet und wägt. Aus dem Gemisch von Stearat und Palmitat werden die Säuren durch Salzsäure abgeschieden und nach dem Auswaschen mit Alkali titriert oder in die Baryumsalze übergeführt, das Molekulargewicht des Gemisches bestimmt, woraus sich dann der Gehalt an Palmitinsäure und Stearinsäure berechnen läßt. Die Lösung vom Palmitat und Stearat wird verdunstet und das myristinsäure Lithium bei 100° C getrocknet und gewogen. Hierauf zerlegt man das Salz mittels Salzsäure und bestimmt das Molekulargewicht durch Titrieren.

5. Bestimmung der Ölsäure.

Enthalten die unlöslichen Fettsäuren außer der Ölsäure keine anderen ungesättigten Säuren, so läßt sich der Gehalt an Ölsäure aus der Jodzahl bestimmen. Zu diesem Zweck ermittelt man die Jodzahl der abgeschiedenen Fettsäuren. Wurde für die Fettsäuren eine Jodzahl J gefunden, die für Ölsäure theoretisch berechnete Jodzahl ist 89,96, so erhält man den Ölsäuregehalt in Prozenten nach folgender Proportion

$$89,96 : 100 = J : x; \quad x = \frac{100 J}{89,96} \quad \text{oder} \quad x = 1,1116 J.$$

Das von David²⁾ zur Trennung der Ölsäure von den gesättigten Säuren angewandte Verfahren besteht hauptsächlich darin, daß sich die Ölsäure in einem Gemisch von Alkohol und Essigsäure viel leichter löst, als die festen Fettsäuren (Palmitinsäure und Stearinsäure).

¹⁾ Partheil und Férié, Zur Kenntnis der Fette. Arch. d. Pharm. **241**, 545 (1903).

²⁾ David, Compt. rend. **86**, 1416.

Diese Methode gibt nach den Untersuchungen von O. Hehner und C. Mitchell ¹⁾ keine genauen Resultate. Dagegen erhielten sie bessere Werte bei Anwendung von verdünntem Alkohol, 10—20 g. Die bei der Verseifung eines Fettes erhaltenen Fettsäuren werden in einem Mörser mit 100 ccm verdünntem Alkohol vom spezifischen Gewicht 0,911 verrieben, die Lösung mittels Saugpumpe abgesaugt und der Rückstand mit 100 ccm desselben verdünnten Alkohols gewaschen. Die ungesättigten Fettsäuren resp. die Ölsäure geht vollständig in Lösung, die Palmitinsäure teilweise, während die Stearinsäure fast vollständig ungelöst zurückbleibt und nach dem Abpressen im Filtriertuch als eine perlmutterweiße Masse erhalten wird. Hehner und Mitchell erhielten auf solche Weise eine Stearinsäure, die eine Jodabsorption von nur 2—3 Proz. aufwies.

6. Bestimmung der gesättigten Fettsäuren.

a) Bestimmung der Stearinsäure und Palmitinsäure.

Heintz²⁾ hat seinerzeit versucht, die nichtflüchtigen Fettsäuren durch fraktionierte Fällung in ihre Komponenten zu zerlegen. Die Trennung geschah mittels der Azetate des Bariums, Bleies oder Magnesiums in methylalkoholischer Lösung und liefert für qualitative Zwecke befriedigende Resultate; eine streng quantitative Trennung gelingt jedoch nicht.

In folgender Tabelle bringt Heintz die Schmelzpunkte der Gemische verschiedener Mengen Palmitinsäure und Stearinsäure.

Ein Gemisch von Stearinsäure T.	Palmitinsäure T.	Schmilzt bei ° C	Erstarrt bei ° C
100	0	69,2	—
90	10	67,2	62,5
80	20	65,3	60,3
70	30	62,9	59,3
60	40	60,3	56,5
50	50	56,6	55
40	60	56,3	54,5
35	65	55,6	54,3
32,5	67,5	55,2	54
30	70	55,1	54
20	80	57,8	83,8
10	90	60,1	54,8
0	100	60,1	54,5
		62	—

Aus dem Schmelzpunkt eines Gemisches von Stearinsäure und Palmitinsäure kann nur auf den Stearinsäuregehalt geschlossen werden, besonders wenn beide Komponenten zu etwa gleichen Teilen

¹⁾ O. Hehner und C. Mitchell, Analyst **1896**, 316.

²⁾ Heintz, Über den Walrat. Pogg. Ann. **92**, 429 und 588 (1854); Liebigs Ann. **84**, 305; **88**, 297.

vorhanden sind. Eine Differenz im Schmelzpunkte von $1,5^{\circ}$ stellt einen Unterschied von 20 Proz. Stearinsäure dar.

Die fraktionierte Fällung führt man in folgender Weise aus. Zunächst muß man feststellen, ob die zu untersuchenden Säuren eine einheitliche Säure oder ein Gemisch darstellen. Zu diesem Zwecke bestimmt man den Schmelzpunkt der zu prüfenden festen Säuren, löst davon 1 g in einer genügenden Menge heißen Alkohols (beim Erkalten auf Zimmertemperatur darf die Säure nicht ausfallen) und versetzt noch heiß mit einer Lösung von Magnesiumazetat in Alkohol oder Bariumazetat in Wasser. Bei einem Schmelzpunkt von 53° C wendet man Magnesiumazetat an, von dem man $\frac{2}{7}$ des Gewichtes der angewandten Säure nimmt, während bei Bariumazetat etwa $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{5}$ genügt. Die heiße Mischung läßt man erkalten, wobei sich beim Stehen das Magnesium- resp. Barytsalz ausscheidet, daß man abfiltriert, mit Alkohol mischt, auspreßt und dann durch Kochen in sehr verdünnter Salzsäure zersetzt. Man kocht solange, bis das auf der heißen, sauren Flüssigkeit schwimmende Öl vollkommen klar ist. Die in Freiheit gesetzten Säuren werden auf den Schmelzpunkt untersucht. Um nun festzustellen, ob eine reine Säure oder ein Säuregemisch vorliegt, fügt man zu dem mit Natriumkarbonat neutralisierten Filtrat des Magnesiumazetatniederschlags etwas Ätznatron hinzu, kocht solange, bis die Flüssigkeit nicht mehr nach Alkohol riecht, und versetzt dann mit Salzsäure, wodurch sich die freie Säure ausscheidet. Man bestimmt den Schmelzpunkt und, falls die bei den beiden Säureportionen und bei der ursprünglichen Säure erhaltenen Werte untereinander übereinstimmen, so liegt eine Säure vor; anderenfalls hat man es mit einem Gemisch zu tun.

b) Bestimmung der Arachinsäure und Lignozerinsäure.

M. Tortelli und R. Ruggeri¹⁾ modifizieren die Renardsche Methode in der Weise, daß sie in dem zu untersuchenden Öle die in Äther unlöslichen Bleisalze der festen Fettsäuren darstellen, diese auf dem Filter mit Äther auswaschen, das Filter dann durchbohren und den Inhalt in einen Scheidetrichter bringen, wobei das Volumen der Mischung auf 220 ccm mit Äther aufgefüllt wird. Darauf behandelt man das Gemisch mit 20prozentiger Salzsäure und wäscht mit Wasser nach. Die freigemachten festen Fettsäuren werden in 100 ccm 90prozentigen Alkohols und einen Tropfen Salzsäure durch Erwärmen auf dem Wasserbade bis auf 60° C gelöst und 2—3 Stunden bei 15 — 20° stehen gelassen, wobei sich feine, silberglänzende Nadeln von Lignozerinsäure und sehr dünne, perlmutterartig leuchtende Blättchen von Arachinsäure abscheiden. Die ausgeschiedenen Kristalle bringt man nun auf das Filter, wäscht dreimal mit 10 ccm 90prozentigen Alkohols und dann mehrmals mit 70 prozentigem Alkohol nach. Die

¹⁾ M. Tortelli und R. Ruggeri, Methode zum Nachweis von Baumwollsaamen-, Sesam- und Erdnußöl im Olivenöl. Chem. Zeitung **22**, 600.

auf dem Filter zurückgebliebenen Kristalle löst man in kochendem, absolutem Alkohol und sammelt das Filtrat in einem Kölbchen. Hier-
auf destilliert man den Alkohol ab, löst den Rückstand in 100 ccm
90prozentigen Alkohols und einem Tropfen sehr verdünnter Salzsäure
durch Erwärmen auf dem Wasserbade auf 60° C und läßt 3 Stunden
stehen. Der so erhaltene Niederschlag wird, wie angegeben, aus-
gewaschen, in kochendem, absolutem Alkohol gelöst, die Lösung
in einer gewogenen Schale verdunstet und nach dem Trocknen bei
100° C gewogen. Dieses Säuregemisch schmilzt zwischen 74 und 75,5° C.

7. Bestimmung der einzelnen ungesättigten Fettsäuren.

Eine genaue quantitative Bestimmung der einzelnen ungesättigten
Fettsäuren in Mischungen von solchen ist mittels der in Vorschlag
gebrachten Methoden kaum ausführbar. Liegt ein Gemenge von nur
zwei ungesättigten Fettsäuren mit bekannten Jodzahlen vor, so läßt
sich aus der Jodzahl der Mischung das Mengenverhältnis der beiden
Fettsäuren mit ziemlicher Genauigkeit berechnen, falls die Molekular-
gewichte der Säuren nicht zu nahe beieinander liegen. Besteht das
Säuregemisch beispielsweise aus Öl- und Linolsäure und bedeutet
x die Menge der Ölsäure, y die Menge der Linolsäure, J die Jodzahl
der flüssigen Fettsäuren, 90,07 und 181,42 die theoretischen Jod-
zahlen der Öl- und Linolsäure, so berechnet sich der Prozentgehalt zu
beiden Säuren nach folgenden Gleichungen:

$$\begin{aligned} x + y &= 100. \\ \frac{90,07 x}{100} + \frac{181,42 y}{100} &= J. \end{aligned}$$

Hieraus kann man x und y berechnen.

Die ungesättigten Fettsäuren addieren in ihren alka-
lischen Lösungen bei der Oxydation mit Lösungen von
Kaliumpermanganat soviel Hydroxylgruppen, als sie freie
Valenzen enthalten und bilden gesättigte Oxyfettsäuren,
die dieselbe Anzahl Kohlenstoffatome im Molekül ent-
halten.

Die Oxydation der ungesättigten Fettsäuren eignet sich als eine
exakte Methode zur qualitativen Untersuchung des flüssigen Anteiles
der Fettsäuren.

Die einzelnen Säuren trennt man in der Weise, daß man 1—2 g
des Säuregemisches in Alkohol löst, mit einer heißen alkoholischen
Lösung von $\frac{1}{30}$ — $\frac{1}{40}$ des Gewichtes des angewandten Säuregemisches
an Magnesiumazetat versetzt, wodurch ein Niederschlag entsteht,
der nach Absetzen abfiltriert wird. Der auf dem Filter gesammelte
Niederschlag wird mit wenig Alkohol gewaschen, ausgepreßt und
durch Kochen mit salzsäurehaltigem Wasser zersetzt. Die im
Filtrat gebildete freie Essigsäure wird mit Ammoniak neutralisiert,
das Filtrat dann mit der gleichen Menge Magnesiumazetat weiter
gefällt und der Niederschlag in derselben Weise behandelt. Erhält

man auf Zusatz von essigsaurer Magnesia keine Fällung mehr, versucht man mit $\frac{1}{20}$ des Gewichtes des angewandten Säuregemisches an essigsaurem Baryt in Wasser zu fällen. Schließlich destilliert man den Alkohol ab, kocht die aus dem wässrigen Rückstand durch Salzsäure abgeschiedene Säure mit alkoholischer Kalilösung und zersetzt die Kaliseife mit Salzsäure. Die auf solche Weise erhaltenen Säureproportionen, 8—11, werden aus der alkoholischen Lösung solange umkristallisiert, bis der Schmelzpunkt sich nicht mehr ändert.

Aus dem Schmelzpunkt und Molekulargewicht läßt sich meist die Zusammensetzung des Säuregemisches erkennen.

Zu besseren Resultaten gelangten Hehner und Mitchell¹⁾

beim Behandeln des Fettsäuregemisches bei 0° C mit einer bei 0° C gesättigten methylalkoholischen Stearinsäurelösung.

Die Darstellung der gesättigten Stearinsäurelösung geschieht in der Weise, daß man 3 g reine Stearinsäure in 1 Liter warmen Methylalkohol vom spezifischen Gewicht 0,8183 in einer Stöpselflasche löst und die Flasche über Nacht in Eiswasser bis zum Halse eingesenkt stehen läßt. Nach 12 Stunden wird die Mutterlauge mittels des in Fig. 26 abgebildeten Saughebers abgezogen, ohne den Kolben aus dem Eiswasser zu entfernen.

Etwa 0,5—1,0 g des festen oder 5 g des flüssigen Fettsäure-

gemisches werden in einer Stöpselflasche in 100 ccm in oben beschriebener Weise mit Stearinsäure gesättigtem Methylalkohol gelöst und über Nacht in Eiswasser stehen gelassen. Am nächsten Morgen schüttelt man um, ohne die Flasche aus dem Eis herauszunehmen, und läßt noch eine halbe Stunde im Eiswasser stehen, damit die Kristalle sich besser absetzen. Hierauf wird die alkoholische Flüssigkeit in der oben beschriebenen Weise abgezogen, der Rückstand in der Flasche dreimal hintereinander mit je 10 ccm der auf 0° C abgekühlten gesättigten Stearinsäurelösung nachgewaschen, das Saugrohr mit heißem Alkohol abgespült, der Alkohol verjagt und der bei 100° C getrocknete Rückstand gewogen. Der Schmelzpunkt der auf diese Weise erhaltenen Stearinsäure darf nicht unter 68,5° liegen. Für die von der Kolbenwandung sowie den Kristallen zurückgehaltene Menge der alkoholischen Stearinsäurelösung bringen Hehner und Mitchell eine Korrektur an, sie ziehen vom Gesamtgewicht des Rückstandes 0,005 g ab.

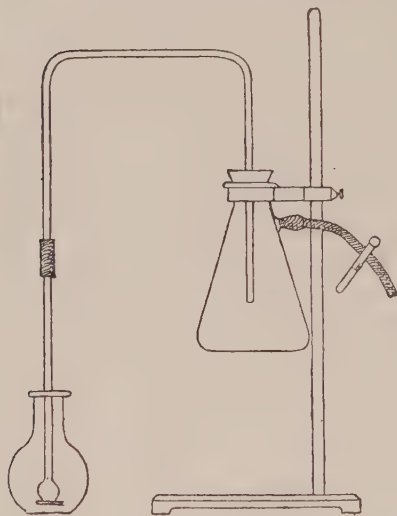


Fig. 19.

¹⁾ Hehner und Mitchell, Analyst 1896, 316.

Kreis und Hafner¹⁾ führen die Trennung der Palmitin- und Stearinsäure in folgender Weise aus. Man bestimmt zuerst im Säuregemisch den Gehalt an Stearinsäure nach Hehner und Mitchell²⁾ und löst in soviel Alkohol auf (s. Tabelle), daß beim Abkühlen auf 0° C die Palmitinsäure in Lösung bleibt und läßt 12—14 Stunden in der Eiskiste stehen, worauf man filtriert. Der Niederschlag wird zweimal aus Alkohol umkristallisiert und stellt dann reine Stearinsäure dar. Das Filtrat, das nur noch 0,12 g dieser Säure in 100 ccm enthält, wird auf die Hälfte eingedampft und mit soviel alkoholischer Magnesiaazetatlösung versetzt, als der in Lösung gebliebenen Stearinsäure entspricht und 12—14 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, worauf man den Niederschlag abfiltriert, aus dem Filtrat die Fettsäure abscheidet und den Schmelzpunkt bestimmt. Liegt dieser noch zu tief, so nimmt man mit Alkohol auf und fällt mit einem Drittel der zuvor angewandten Menge Magnesiumazetat. Nach nochmaligem Umkristallisieren aus Alkohol erhält man reine Palmitinsäure.

Löslichkeit der Stearinsäure und Palmitinsäure.

	Stearin- säure	Palmitin- säure
100 ccm Alkohol von 94,4 Volumproz. lösen bei 0° C	0,1203	0,5160
100 ccm Alkohol von 95,5 Volumproz. mit 10 Volumproz. Methylalkohol	0,1270	0,5380
100 ccm Alkohol von 95 Volumproz. mit 10 Volumproz.	0,1249	0,5642
100 ccm Alkohol von 91 Volumproz. mit 10 Volumproz. Methylalkohol	0,0681	0,3290

Die Oxydation wird in der Weise ausgeführt, daß man 30 g der flüssigen Fettsäuren mit 36 ccm Kalilauge vom spezifischen Gewicht 1,27 verseift, die so erhaltene Seife in Wasser löst und mit 2 Liter einer 1½prozentigen Lösung von Kaliumpermanganat langsam und unter Umrühren vermischt. Nach 10 Minuten langem Stehen fügt man zu dem Gemenge soviel schweflige Säure hinzu, bis sich alles bereits ausgeschiedene Mangansuperoxydhydrat löst und das unverändert gebliebene Kaliumpermanganat reduziert wird, d. h. bis die Lösung schwach sauer reagiert. Die abgeschiedenen Säuren (A) — Dioxystearinsäure und Sativinsäure — werden abfiltriert, auf Tonplatten getrocknet und zunächst mit wenig kaltem Äther extrahiert, um die unoxydiert gebliebenen Fettsäuren zu entfernen, und darauf mit größeren Mengen Äther (für je 20 g Säure 2 Liter Äther) bei gewöhnlicher Temperatur ausgezogen. Beim Einengen der ätherischen Lösung auf 150 ccm und darauffolgendem Erkalten scheidet sich Dioxystearinsäure aus, die man aus Alkohol umkristallisiert. Der

¹⁾ Kreis und Hafner, Chem. Zentralbl. 1897, I.

¹⁾ Kreis und Hafner, Über natürlich vorkommende und synthetisch dargestellte gemischte Fettsäureglyzeride. Chem. Ber. 36, 2766 (1903).

²⁾ Hehner und Mitchell, Über Stearinsäurebestimmungen. Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- und Genußmittel 6, 22 (1903).

von kaltem Äther ungelöste Anteil, die Sativinsäure, wird wiederholt mit großen Mengen Wasser gekocht und kristallisiert.

Das saure, linusinsäurehaltige Filtrat (B) wird mit Kalilauge neutralisiert, auf dem Wasserbade bis $\frac{1}{12}$ — $\frac{1}{14}$ seines Volumens eingedampft und mit Schwefelsäure angesäuert, wobei ein brauner, flockiger Niederschlag entsteht, der an der Luft getrocknet und mit Äther extrahiert wird, um die Azelainsäure und andere sekundäre Oxydationsprodukte zu entfernen. Schließlich wird der Rückstand (der unlösliche Anteil) aus absolutem Alkohol umkristallisiert. Aus der Kristallform läßt sich entscheiden, ob nur Linusinsäure oder auch Isolinusinsäure zugegen ist. Die Linusinsäure kristallisiert in Form von abgestumpften rhombischen Tafeln, die Isolinusinsäure bildet Nadeln. Beide Säuren lassen sich durch Kristallisation aus wenig Wasser trennen, in dem die Linusinsäure schwer löslich ist.

Hegner versuchte, eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Linolensäure auszuarbeiten, die auf der Schwerlöslichkeit des Linolensäurehexabromides in Äther und anderen Lösungsmitteln beruht. Bei der Einwirkung von Brom auf die flüssigen Fettsäuren verschiedener Öle entsteht nach Hazura ein bei 114—115° C schmelzendes, in Alkohol, Äther und Eisessig lösliches Bromid $C_{18}H_{32}O_2Br_4$, und ein bei 177° C schmelzendes, in diesen Lösungsmitteln sehr schwer lösliches Bromid $C_{18}H_{30}O_2Br_6$. Ersteres geht beim Erhitzen mit Zinn und Salzsäure in alkoholischer Lösung in Linolsäure $C_{18}H_{32}O_2$ über, letzteres in Linolensäure $C_{18}H_{30}O_2$.

Zur Bromierung der Fettsäuren löst man etwa 0,3 g in 10 ccm Essigsäure, kühlt in verkorkter Flasche auf + 5° C ab und fügt tropfenweise Brom hinzu, bis die Bromfarbe bleibt und läßt 3 Stunden stehen. Hierauf filtriert man durch ein Soxhletasbestrohr ab, wäscht mit gekühlter Essigsäure, Alkohol und Äther in Portionen von je 5 ccm sukzessive aus und trocknet den weißen Rückstand im Wassertrockenschrank bis zur Gewichtskonstanz. Will man die Menge des mit ausgefallten Tetrabromids bestimmen, so ermittelt man den Bromgehalt des Filtrerrückstandes. Da ein Hexabromid der Theorie nach 63,32 Proz. und ein Tetrabromid 53,3 Proz. Brom enthält, so können die Mengen der einzelnen Säuren aus den folgenden Gleichungen berechnet werden:

$$\begin{aligned} x + y &= 100, \\ \frac{63,3}{100} x + \frac{53,3}{100} y &= B, \quad x = 10 (B - 53,3), \end{aligned}$$

worin x die Prozentzahl der Hexabromide, y die Prozentzahl des Tetrabromids und B die Prozentzahl von Brom in dem rohen Bromidgemisch bedeutet.

8. Oxyfettsäuren.

Fahrion ¹⁾ hat zuerst festgestellt, daß die Oxyfettsäuren in Petroleumäther unlöslich sind und benutzte diese Eigenschaft zur Trennung der Oxyfettsäuren von den übrigen Fettsäuren. Zu diesem Zweck verseift man 2—3 g der Probe in einer Porzellanschale mit 10 ccm 8prozentiger alkoholischer Natronlauge auf dem Wasserbade, dampft den Alkohol ab und löst die Seife in heißem Wasser. Die Lösung bringt man in einen Scheidetrichter, versetzt sie mit Salzsäure, schüttelt nach dem Erkalten mit 25 ccm Petroleumäther gut durch und läßt das Ganze stehen, bis sich zwei klare Schichten gebildet haben. Die

¹⁾ Fahrion, Über oxydiertes Kottonöl und eine allgemeine Methode zur Analyse oxydierter Öle. Zeitschr. für angew. Chem. 1898, 78.

saure wässrige Lösung wird unten abgelassen, der Petroläther oben abgezogen und die in Form einer zähen, klebrigen Masse im Scheidetrichter zurückgebliebenen Oxyssäuren mit Petroläther gewaschen. Bei einer großen Menge von Oxyfettsäuren empfiehlt es sich, sie nochmals in verdünnter wässriger Natronlauge zu lösen, mit Salzsäure zu fällen und mit Petroläther auszuschütteln und auf solche Weise die unoxydierten Fettsäuren zu entfernen. Die so erhaltenen Oxyfettsäuren werden nun in warmem Alkohol gelöst, der Alkohol verdunstet und der Rückstand bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Diese Methode ist jedoch nur dann anwendbar, wenn das zu prüfende Säuregemisch keine Rizinolsäure enthält, die in Petroläther nicht absolut unlöslich ist. In solchen Fällen empfiehlt es sich, die Oxyfettsäuren durch Ermittlung der Azetylzahl zu bestimmen, wenn selbstverständlich die Natur der Oxyfettsäure bekannt ist. Auch die beim Azetylieren eintretende Gewichtszunahme gibt ein Maß für den Gehalt an Oxyfettsäuren, doch sind geringe Verluste infolge der Bildung von Anhydriden nicht zu vermeiden, weswegen diese Arbeitsweise nur dann zu empfehlen ist, wenn der Gehalt des zu prüfenden Fettes an Oxyfettsäuren ein hoher ist.

Die durch Petroläther aus oxydierten Fetten abscheidbaren Säuren sind braun bis braunschwarz, von zäher oder harzartiger, seltener von pulveriger Beschaffenheit. Sie enthalten fast immer beträchtliche Mengen innerer Anhydride und haben daher bedeutend höhere Verseifungszahlen als Neutralisationszahlen.

IX. Untersuchung der unverseifbaren Bestandteile.

Die aus einem Fett oder Öl abgeschiedenen unverseifbaren Substanzen können fest oder flüssig sein.

Sind die unverseifbaren Substanzen fest, so können Paraffin, Ceresin und feste Fettalkohole sowie Cholesterine vorliegen; die flüssigen Substanzen bestehen gewöhnlich aus Mineralölen, Teerölen, Harzölen oder aus einem Gemenge dieser Öle mit höheren Alkoholen.

Ferner unterscheidet man unverseifbare Substanzen, die natürlich vorkommen und solche, die als Beimengung gefunden werden.

Einen Einblick in die Natur der unverseifbaren Bestandteile gewährt das zweistündige Kochen der zu prüfenden Substanz mit dem gleichen Gewichtsteile Essigsäureanhydrid am Rückflußkühler. Es können drei Fälle eintreten.

1. Das Unverseifbare löst sich vollständig in Essigsäureanhydrid und es scheidet sich nichts beim Erkalten aus: Fettalkohole.

2. Das Unverseifbare löst sich beim Kochen vollständig auf, erstarrt aber beim Erkalten zu einem Kristallbrei. Das deutet auf die Anwesenheit von Cholesterinen oder von hochmolekularen Fettalkoholen hin, oder auf ein Gemisch von beiden Körperklassen.

3. Löst sich das Unverseifbare nicht beim Kochen in Essigsäureanhydrid, sondern schwimmt als klare ölige Flüssigkeit obenauf und erstarrt beim Erkalten, so können Paraffin, Ceresin vorliegen oder auch hochmolekulare, aliphatische Alkohole, falls ein merklicher Teil der Probe in Lösung bleibt oder sich in der Flüssigkeit kristallinisch ausscheidet.

Die nach 1. erhaltene Lösung wird nach dem Erkalten in Wasser gegossen, wobei sich die Essigsäureester der Fettalkohole ausscheiden, die zwei- bis dreimal mit Wasser ausgewaschen werden, um das Essigsäureanhydrid zu entfernen, und dann in Alkohol gelöst. Die alkoholische Lösung wird nun mit warmem Wasser versetzt, wodurch sich die Ester als ölige Schicht ausscheiden, die man

dann in kaltes Wasser setzt, um sie zum Erstarren zu bringen. Die Charakterisierung der Substanz geschieht durch die Bestimmung des Schmelzpunktes und der Azetylverseifungszahl, sowie der Jodzahl der nicht azetylierten Alkohole.

Die nach 2. erhaltene Lösung wird nach dem Erkalten in Wasser gegossen, wobei sich die Essigsäureester ausscheiden, die man zwei- bis dreimal mit Wasser auskocht und in Alkohol löst. Liegt ein Gemisch von Cholesterinen mit aliphatischen Alkoholen vor, so erkennt man die Gegenwart ersterer daran, daß man zu ihrer Lösung sehr viel kochenden Alkohol braucht und daß die Essigsäureester sich beim Erkalten zum größten Teil wieder ausscheiden. Die Gegenwart der Cholesterine wird auch durch die charakteristischen Reaktionen nachgewiesen.

Das von C. Hell zur Molekulargewichtsbestimmung der Fettalkohole und dann von A. und P. Buisine zur Untersuchung von Bienenwachs benutzte

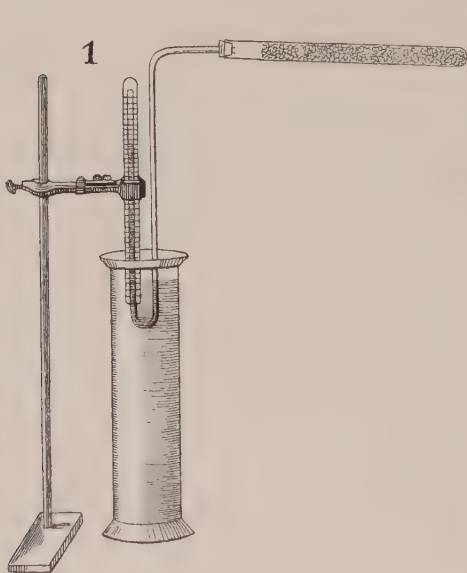


Fig. 20.

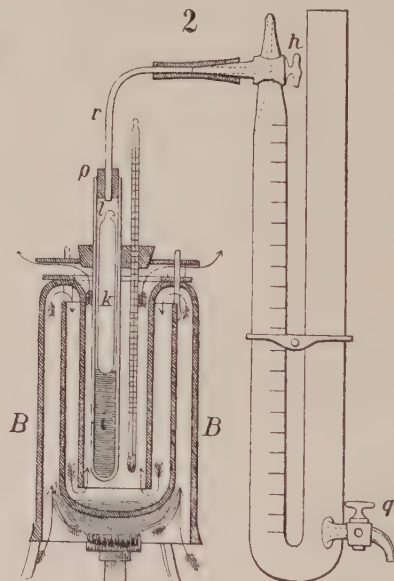


Fig. 21.

Verfahren beruht auf der von Dumas und Stas entdeckten Reaktion, nach der Fettalkohole bei mäßigem Erhitzen mit Natronkalk sich in die entsprechenden Säuren unter Wasserstoffentwicklung umwandeln, wie aus folgender Gleichung ersichtlich ist:



Man kann den entwickelten Wasserstoff als Maß für die angewandte Menge des Fettalkohols benutzen.

Hell ¹⁾ bringt die mit Natronkalk (aus 1 Teil Ätznatron und 2 Teilen Kalk bestehend) innig vermischte Substanz (auf 1 g Substanz 3 Teile Natronkalk) in das Rohr *i*, (Fig. 21) überschichtet die Mischung mit Natronkalk und schiebt das leere, an beiden Enden zugeschmolzene Rohr in *i* ein, um das durch Erwärmung und Druckverminderung ausdehnbare Luftvolumen zu reduzieren. Das Rohr *i* wird mit einem Gummistopfen *p* verschlossen, der das mit einer Hofmannschen Gasbürette verbindende Rohr *r* trägt; die Gasbürette ist ganz mit Quecksilber gefüllt und mit dem Dreiwegehahn *h* verschlossen. Nun setzt man durch den Hahn *b* das Rohr *i* mit der äußeren Luft in Verbindung, stellt den Barometerstand und die Zimmertemperatur fest und verbindet das Rohr *i* mit der Bürette durch Drehen des Hahnes *h*. Hierauf läßt man durch den

¹⁾ Hell, Lieb. Ann. 223, 269 (1884).

Hahn *q* etwas Quecksilber abfließen, erhitzt das Luftbad auf 300—310° C, bis das Quecksilberniveau konstant bleibt und, nachdem der Apparat sich bis auf die Anfangstemperatur abgekühlt hat, stellt man den ursprünglichen Druck durch Zugießen von Quecksilber wieder her. Man liest das Volumen des Wasserstoffgases ab und reduziert es auf 0° und 760 mm Druck. Das Wasserstoffgas wird entweder feucht gemessen unter Berücksichtigung der Tension des Wasserdampfes, oder man trocknet es zuvor, indem man das Rohr *i* länger wählt und über die Luftverdünnungsröhre *k* eine Schicht gut ausgeglühten Natronkalkes bringt.

A. und P. Buisine haben gezeigt, daß die Reaktion nicht quantitativ verläuft, wenn man das Wachs direkt mit Kalikalk erhitzt und empfehlen, eine genau gewogene Menge Wachs (2—10 g) in einem Porzellantiegel zu schmelzen, das gleiche Gewicht feingepulverten Kalihydrats hinzuzufügen und bis zum vollständigen Erkalten umzurühren. Die hart gewordene Masse wird fein pulverisiert, mit 3 Teilen Kalikalk innig gemischt, in einen kleinen birnenförmigen Kolben gebracht und dieser in einen eisernen, mit Quecksilber gefüllten Kessel eingesetzt, dessen Deckel mit drei Öffnungen versehen ist. Durch die eine Öffnung wird das Kölbchen eingesetzt, die zweite trägt ein Thermometer und die dritte ein langes Rohr zur Verdichtung der Quecksilberdämpfe.

Zum Aufsaugen des Gases benutzten A. und P. Buisine ¹⁾ statt der Hoffmannschen Gasbürette einen von Dupré angegebenen Apparat.

Die nach 3 erhaltene, beim Erkalten erstarrte Masse (1 g) wird bei 20° C in 10 ccm Schwefelkohlenstoff gelöst; bei mehr als 10 Proz. Ceresin ist die Lösung nicht klar. Von dieser Lösung versetzt man 1 ccm bei 20° C mit einer Mischung von 5 ccm Äther und 5 ccm 96prozentigem Alkohol; — reines Paraffin zeigt hierbei keine Ausscheidung, während ceresinhaltiges, je nach der Menge Ceresin, eine mehr oder minder starke flockige Ausscheidung gibt, die in ihrem Aussehen an die mit Ammoniak aus sehr verdünnter Lösung gefällte Tonerde erinnert.

Diese, von E. Graefe²⁾ vorgeschlagene Methode gestattet, Mengen bis zu 1 Proz. Ceresin im Paraffin nachzuweisen.

Zweckmäßiger soll nach Berliner der Nachweis des Paraffins durch die refraktometrische Prüfung zu erbringen sein, da die Refraktion bei 90° C von Paraffinen 1,5—4,0 beträgt, während Ceresin bei 90° C die Refraktometerzahl 11,5—13 hat.

Die flüssigen unverseifbaren Stoffe bestehen in den meisten Fällen aus Mineralölen, Harzölen und Teerölen oder aus einem Gemisch dieser Öle.

1. Mineralöle.

Die Mineralöle siedeln bei 250—300° C, haben ein spezifisches Gewicht von 0,855—0,900, höher siedende 0,900—0,930, sind in Alkohol schwer löslich, verhalten sich gegen chemische Reagenzien, wie Schwefelsäure, Salpetersäure usw. indifferent und zeichnen sich besonders durch ihr Fluoreszenzvermögen aus.

2. Harzöle.

Zum Nachweis von Harzöl sind folgende Reaktionen vorgeschlagen worden:

1. Die Liebermann-Storcksche Reaktion. Versetzt man 1 ccm Harzöl mit 1 ccm Essigsäureanhydrid, schüttelt um, pipettiert das Essigsäureanhydrid ab und fügt einen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure (Morwaski schlägt vor, Schwefelsäure vom spezifischen Gewicht 1,53 anzuwenden) hinzu, so entsteht sofort eine violette Färbung, die nach kurzer Zeit verblaßt und in Braun übergeht. Bei Gegenwart von fetten Ölen ist diese Reaktion nicht anwendbar, da diese ähnliche Färbungen geben, die die Erkennung des Harzöles erschweren resp. unmöglich machen. Man muß sich auch überführen, daß kein Cholesterin zugegen ist.

¹⁾ A. und P. Buisine, Bull. Soc. Chim., Paris (3) 3, 867.

²⁾ E. Graefe, Über den Nachweis von geringen Mengen Ceresin im Paraffin. Chem. Zeitung 1903, 248.

Zur quantitativen Bestimmung der Harzöle verfährt man nach Storch¹⁾ in der Weise, daß man die zu prüfende ölfreie Substanz (10—15 g) mit der fünffachen Menge 96prozentigen Alkohols schüttelt oder gelinde erwärmt; dieser nimmt die Harzöle und wenig Mineralöl auf. Die alkoholische Lösung wird (nach dem Erkalten) in ein tariertes Bechergläschen abgegossen, verdunstet, der Rückstand A gewogen und mit der zehnfachen Menge Alkohol übergossen. Auch diese alkoholische Lösung wird von dem ungelöst bleibenden Mineralöl abgegossen, verdunstet und der Rückstand B gewogen. Dieser enthält außer den Harzölen noch diejenige Menge Mineralöl, die in dem Alkohol der zweiten Lösung löslich war; dessen Menge läßt sich aus der Differenz der in beiden Lösungen angewandten Alkoholmengen und der beiden Rückstände berechnen:

Es seien 11,2 g der Probe mit 50 g, der Rückstand B mit 15,5 g Alkohol behandelt worden. Rückstand A wiegt 1,51 g, Rückstand B 1,15 g, folglich haben (50—15,5) 34,5 g Alkohol (1,51—1,15) 0,36 g und daraus 15,5 g Alkohol 0,162 g Mineralöl gelöst. Somit sind $1,15 - 0,162 = 0,988$ g = 8,8 Proz. Harzöl enthalten.

3. Teeröle.

Den Nachweis und die quantitative Bestimmung der Teeröle gründet E. Valenta²⁾ auf die Eigenschaft der Kohlenwasserstoffe der Benzolreihe, sich mit Dimethylsulfat in jedem Verhältnis zu mischen, im Gegensatz zu den Mineralölen, die in der Kälte unlöslich, und den Harzölen, die sehr wenig löslich sind.

Valenta verfährt bei der Ausführung der Probe derart, daß er eine genau abgemessene Menge der zu untersuchenden Ölprobe in einen in halbe Kubikzentimeter geteilten, mit Glasstöpsel versehenen Zylinder von 100 cm Inhalt bringt und eine ebenfalls genau gemessene, etwa $1\frac{1}{2}$ —2fache Menge Dimethylsulfat hinzufügt. Man schüttelt dann eine Minute, läßt stehen, bis zur vollständigen Trennung der Schichten, liest ab und berechnet aus dem Volumen der unteren Schicht, wieviel Öl das Dimethylsulfat gelöst hat.

Gewichtsanalytisch bestimmt Valenta nach dieser Methode die Teeröle, indem er eine gewogene Menge der Ölprobe mit Dimethylsulfat schüttelt, die Lösung mit Natronlauge kocht, das überschüssige Alkali neutralisiert, das ausgeschiedene Öl mit Äther ausschüttelt und den Rückstand nach dem Verdampfen des Äthers wägt. Ed. Graefe empfiehlt, alkoholische Lauge anzuwenden, da die Reaktion bereits in der Kälte beginnt und nur durch kurzes Erwärmen, wenn nötig unter Zusatz von weiterem Alkali, zu Ende geführt zu werden braucht.

X. Bestimmung und Trennung der Mineralstoffe.

A. Aschenanalyse.

Rohasche und Reinasche.

Unter Asche versteht man den nach der Verbrennung einer Substanz zurückgebliebenen Anteil, wobei man Rohasche und Reinasche unterscheidet. Bei der Ausführung der Veraschung bedient man sich gewöhnlich einer flachen, mit seitlicher Löcherung versehenen Platinschale, in die man 5—10 g lufttrockene Substanz bringt und anfangs mit kleiner fächelnder Flamme erhitzt, bis sie verkohlt ist, d. h. bis die Entwicklung von Rauch oder brennbaren Gasen aufgehört hat. Nun setzt man zur Verstärkung des Luftzuges einen kleinen Schornstein auf und läßt die Verbrennung bei mäßiger Flamme vollständig vor sich gehen, bis der Inhalt der Schale weiß

¹⁾ Storch, Ein Vorschlag zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Harzölen im Mineralschmieröl. Ber. österr. Ges. z. Förd. d. chem. Ind. 9, 93 (1887).

²⁾ E. Valenta, Über die Verwendung von Dimethylsulfat zum Nachweis und zur Bestimmung von Teerölen usw. Chem. Zeitung 1906, 266.

oder hellgrau geworden ist und keine bemerkbaren Kohlepartikel enthält. Um ein Verstäuben feinpulveriger Substanzen zu vermeiden, durchfeuchtet man die Substanz in der Platinschale mit Alkohol, zündet diese ohne Anwendung einer Flamme an, läßt ihn abbrennen und erhitzt mit der Flamme weiter. Bei leicht verbrennlichen Stoffen erhitzt man bis zur Entzündung, entfernt die Flamme und läßt die Substanz für sich weiter brennen, wobei durch ein allmähliches Verglimmen im Innern der verkohlten Substanz ein fast vollständiges Veraschen stattfindet. Oft ist es auch nötig, um eine weiße Asche zu erhalten, die Substanz mit etwas Wasser oder chemisch mit einem Wasserstoffsuperoxyd anzufeuchten, auf dem Sandbade langsam trocknen zu lassen und schließlich mit einer stärkeren Flamme zu erhitzen.

Handelt es sich aber um die genaue Ermittlung der Zusammensetzung einer Asche, so muß der Gehalt der Rohasche an Reinasche bestimmt werden. Bei der Verbrennung findet sich in der Rohasche stets als direktes Verbrennungsprodukt organischer Stoffe Kohlensäure, die man zum größten Teile als Produkt der Verbrennung der organischen Substanz ansehen kann. Die tierischen und pflanzlichen Stoffe enthalten Kalk, Magnesia und Alkalien, an organische Säuren gebunden, die bei der Veraschung zerstört werden, wobei die hierbei entstehende Kohlensäure von diesen Basen gebunden wird und es bilden sich kohlen saure Salze, deren Kohlensäure jedoch den ursprünglich in der veraschen Substanz vorhandenen Stoffen nicht zuzurechnen ist. Zieht man nun von der so erhaltenen Rohasche die sehr schwer zu entfernenden Kohlentelchen und die Kohlensäure der basischen Körper ab, so erhält man die Menge Reinasche.

Zur Bestimmung größerer Aschenmengen verwendet man eine geräumige Platinschale und läßt zuerst, um Verluste an leichtflüchtigen Stoffen, wie Chloralkalien, zu vermeiden, eine ganz schwache Flamme einwirken, wobei eine sehr langsame Verkohlung stattfindet, die Gase entwickeln sich ruhig und gleichmäßig und die Masse bleibt locker. Sobald die Gasentwicklung aufgehört hat, steigert man allmählich die Hitze, jedoch nicht bis zum Glühen, wodurch ein vollständiges Verbrennen der Kohle in der lockeren Masse stattfindet und kein Schmelzen der Asche. Gelingt es aber nicht, auf diese Weise eine möglichst kohlearme Asche zu erhalten, so empfiehlt sich, die noch kohlehaltige Asche in der Platinschale mit einem Pistill zu zerreiben, mit heißem Wasser wiederholt zu extrahieren und durch ein aschefreies Filter zu filtrieren. Der Rückstand samt Filter wird in der Platinschale weiß gebrannt, das Filtrat dem Schaleninhalt hinzugefügt, bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand geglüht und gewogen.

Veraschung auf nassem Wege nach Neumann.

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, daß verkohlte Massen bedeutend langsamer oxydiert werden, als die ursprüngliche organische Substanz. Die Verkohlung wird vermieden durch langsames, be-

ständiges Zufügen eines äußerst wirksamen Oxydationsmittels, das aus einem Gemisch von gleichen Teilen konzentrierter Schwefelsäure vom spezifischen Gewicht 1,84 und konzentrierter Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,42 besteht.

Die Veraschung oder Oxydation wird in der Weise ausgeführt, daß man die zu untersuchende Substanz in einem Kjeldahlkolben oder Rundkolben mit einer gemessenen Menge (5—10 ccm) des Säuregemisches übergießt und einige Minuten stehen läßt, bis die Hauptreaktion, die Entwicklung der Nitrodämpfe, nachgelassen hat. (Da das Fett resp. Öl nicht immer unmittelbar, sondern in Form einer alkoholischen, ätherischen oder anderen Lösung in den Kolben gebracht wird, so muß vor dem Zusatz des Säuregemisches das Lösungsmittel zuerst vollständig abgedampft und der Kolben abgekühlt werden, um eine Explosion zu vermeiden.) Hierauf erwärmt man den Kolben mit einer ganz kleinen Flamme, und sobald die Flüssigkeit sich zu schwärzen beginnt, läßt man aus einem an einem Stativ befestigten Tropftrichter langsam einige Tropfen hinzufließen und erhitzt weiter, bis sich die Flüssigkeit wieder dunkel färbt. Diese Manipulation wird solange wiederholt, bis die Flüssigkeit sich nicht mehr schwärzt und nach weiterem Erhitzen unter Hinzufügen von etwas Säuregemisch hellgelb oder wasserklar wird, worauf man die Flüssigkeit erkalten läßt. Diese darf sich beim Erhitzen nicht mehr färben. Die Menge des hinzugesetzten Säuregemisches darf 40 ccm nicht überschreiten.

Man kann auch im Anfang 20—25 ccm Säuregemisch hinzufügen und dann konzentrierte Salpetersäure tropfenweise hinzufließen lassen.

Veraschung unter Zusätzen.

Die von Volhard angegebene Methode besteht darin, daß man die zu untersuchende Substanz in einem geräumigen Porzellantiegel mit der zehnfachen Menge eines Gemisches von einem Teil wasserfreier Soda, und zwei Teilen Salpeter mischt und erhitzt mit kleiner Flamme bis zum ruhigen Schmelzen.

Wendet man Kalilauge als Lösungs- oder Oxydationsmittel an, so dampft man die im Nickeltiegel mit Kalilauge übergossene Substanz zur Trockne ein und fügt den Salpeter in kleinen Portionen hinzu.

Die weißgeschmolzene Masse löst man nach dem vollständigen Erkalten und Ansäuern mit Essigsäure, dann Salpetersäure und kocht zur Entfernung der salpetrigen Säure eine halbe Stunde.

Als Zusatz wird bei der Veraschung von Pflanzen auch Natriumkarbonat angewandt. 20—25 g Substanz werden mit einer Lösung von chemisch reinem, wasserfreiem Natriumkarbonat (50 g im Liter) auf dem Wasserbade in einer Platinschale bis zur Trockne verdampft und verascht. Bei schwefelhaltigen Substanzen erhitzt man mit einer Spiritusflamme, da das Leuchtgas Schwefelverbindungen enthält, die die Resultate beeinträchtigen. Um eine vollständige Veraschung

zu erzielen, zerdrückt man die verkohlte Masse mit dem Pistill, befeuchtet sie wiederholt mit Wasserstoffsuperoxyd, erwärmt auf dem Wasserbade bis zur Trockne und erhitzt bis die Schmelze vollständig weiß geworden ist.

Die Zerstörung auf nassem Wege erreicht man mit chlorsaurem Kali und Salzsäure, indem man die gewogene, feinpulverisierte Substanz in einer tarierten Porzellanschale mit Wasser und etwas Salzsäure auf dem Wasserbade erwärmt. Fügt wiederholt geringe Mengen reinen chlorsauren Kali zu; konzentriert die Lösung, nimmt den Rückstand mit Wasser und Salzsäure auf, fügt von neuem chlorsaures Kali hinzu und wiederholt diese Operation, bis die Flüssigkeit nur noch schwachgefärbte Fetzen enthält, und beim Eindampfen zur Trockne nicht mehr braun oder schwarz wird. Nachdem man nun mit Wasser und Salzsäure gelöst hat, um das letzte chlorsaure Kali zu zersetzen und so das Chlor zu entfernen, dampft man zur Trockne ein. Der Rückstand wird in heißem Wasser gelöst und die filtrierte Lösung untersucht.

Veraschung mit Natriumsuperoxyd. v. Asboth mischt 0,2—0,5 g der Substanz mit genau 10 g kalzinierter Soda und 5 g Natriumsuperoxyd und erwärmt mit einer kleinen Flamme, so daß der Tiegel von derselben nicht berührt wird, erhitzt dann stärker, bis die Schmelze dünnflüssig geworden ist. Hierauf wird die Schmelze in Wasser gelöst, das Filtrat mit bromhaltiger Salzsäure bis zum Verschwinden des Bromgeruchs gekocht und dann gefällt.

Bestimmung der einzelnen Bestandteile der Asche.

Es ist sehr zweckmäßig, die in der Asche enthaltenen Mineralstoffe, Kieselsäure, Kalk, Magnesia, Kalium und Natrium in einer Substanzprobe und Chlor, Schwefelsäure, Phosphorsäure in je einer Probe zu bestimmen.

Kieselsäure. Man verkohlt die lufttrockene Substanz (20 bis 30 g) in einer Platinschale mit kleiner Flamme, zerreibt mit verdünnter Salzsäure und dampft auf dem Wasserbade zur Trockne ein. Zur vollständigen Ausscheidung der Kieselsäure befeuchtet man den Trockenrückstand mit etwas konzentrierter Salzsäure, dampft wieder zur Trockne ein und wiederholt diese Manipulation zwei- bis dreimal, dann trocknet man bei 110—120° C. Nimmt man den Rückstand mit heißem Wasser und etwas Salzsäure auf, so bleibt Kieselsäure zurück und man bringt sie auf ein aschefreies Filter, wäscht nach, trocknet, glüht stark und wägt nach dem Erkalten. Die Kieselsäure muß, falls sie keinen Sand enthält, weiß sein und darf beim Abrauchen mit Flußsäure auf dem Platinblech keinen Rückstand hinterlassen.

Das salzsaure, von der Kieselsäure befreite Filtrat wird auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und zur Bestimmung der Alkalien und Erdalkalien und anderen verwandt.

1. Erdalkalien und Alkalien.

a) Nachweis.

Man löst eine Probe der Asche in Salzsäure, fügt etwas Eisenchlorid hinzu, fällt die Phosphorsäure durch Ammoniumazetat in schwach essigsaurer Lösung aus und prüft das Filtrat vom Niederschlag mit Ammoniak und Ammoniumoxalat, wobei ein Niederschlag oder eine Trübung auf die Gegenwart von Kalzium hindeutet. Das Magnesium weist man nach, indem man das Kalzium durch Zusatz von Ammoniumoxalat aus dem Filtrat entfernt und dieses mit Natriumphosphat versetzt — ein fein kristallinischer Niederschlag von Magnesiumammoniumpyrophosphat zeigt Magnesium an.

Der Nachweis der Alkalien mittels der Flammenfarbe gelingt nur beim Kalium. Natrium gibt eine Gelbfärbung, die aber infolge seiner Verbreitung fast überall zu beobachten ist. Kalium färbt die Flamme violett, wird aber von der Natriumflamme überdeckt; beobachtet man diese beiden Flammen durch ein blaues Kobaltglas, so verschwindet die Natriumfärbung, während die Kaliumfärbung stehen bleibt. Durch die Fällungsmethoden geschieht der Nachweis nach der bei der quantitativen Bestimmung angegebenen Methode.

b) Quantitative Bestimmung.

Kalk. Ein aliquoter Teil der salzsauren Lösung wird vorsichtig mit Ammoniak bis zur schwachsauren Reaktion versetzt; hierauf fügt man 5—10 ccm einer 10prozentigen Eisenchloridlösung und konzentrierte Ammoniumazetatlösung zur Entfernung der Phosphorsäure und 1—2 Tropfen Essigsäure hinzu, kocht auf, wobei ein rotbrauner Niederschlag von basisch phosphorsaurem und basisch essigsaurem Eisenoxyd in schwach essigsaurer Lösung entsteht. Man läßt den Niederschlag an einem warmen Orte absitzen, filtriert ihn durch ein gut laufendes Filter möglichst rasch ab und wäscht ihn sorgfältig mit heißem Wasser aus, dem einige Tropfen Ammoniumazetat zugesetzt sind. Das Filtrat wird nun ammoniakalisch gemacht, erhitzt, mit Ammoniumoxalat heiß gefällt und der Niederschlag nach einigen Stunden abfiltriert und ausgewaschen. Der so erhaltene oxalsäure Kalk wird durch starkes Glühen im Platintiegel in Kalziumoxyd übergeführt und als solches gewogen. Das Glühen muß ein- bis zweimal bis zur Gewichtskonstanz wiederholt werden. Aus dem gefundenen Wert berechnet man die Menge Kalzium durch Multiplikation mit dem Faktor 0,7149.

Magnesia. Das Filtrat der Kalkfällung wird auf dem Wasserbade eingengt, mit $\frac{1}{3}$ des Flüssigkeitsvolumens 10prozentigen Ammoniaks und Natriumphosphat versetzt, wobei ein Niederschlag von Ammoniummagnesiumphosphat ausfällt, den man nach 12stündigem Stehen abfiltriert, mit $2\frac{1}{2}$ prozentigem Ammoniak auswäscht, trocknet und verascht, indem man zunächst mit kleiner Flamme erhitzt und dann stark glüht, bis der Niederschlag rein weiß geworden ist. Nach dem Erkalten im Exsikkator wägt man das gebildete Magnesiumpyrophosphat $Mg_2P_2O_7$ und berechnet hieraus die Menge Mg durch Multiplikation mit dem Faktor 0,2188, die Menge MgO mit dem Faktor 0,3625.

Kalium und Natrium. Ein aliquoter Teil der salzsauren Aschenlösung wird zur vollständigen Ausfällung der Phosphorsäure

mit 5—10 ccm einer 10prozentigen Eisenchloridlösung versetzt und zur Trockne eingedampft. Der Trockenrückstand wird mit einigen Tropfen Salzsäure durchfeuchtet, in heißem Wasser gelöst, die Lösung mit Bariumhydroxyd versetzt, wodurch ein Niederschlag von basischem Phosphat von Magnesia und Schwefelsäure entsteht, der abfiltriert wird. Das Filtrat wird ammoniakalisch gemacht, mit Ammoniumkarbonat versetzt, um den Überschuß des Baryts und den Kalk zu entfernen. Das Filtrat vom weißen Niederschlag der Karbonate enthält die Chloride der Alkalien und Ammoniumsalze; man verdampft es in einer Porzellanschale zur Trockne und glüht vorsichtig, bis die gesamte Menge des Ammoniumkarbonats und des Ammoniaks sich verflüchtigt hat. Der Rückstand wird mit wenig Wasser aufgenommen, die Lösung durch ein kleines Filter in eine tarierte Platinschale filtriert und auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft. Der Abdampfrückstand wird nur mit wenig Salzsäure befeuchtet, wieder getrocknet, schwach geglüht und nach dem Erkalten gewogen. Man erhält auf solche Weise die Gesamtmenge des Kalium- und Natriumchlorids. Die Trennung beider erfolgt mittels Platinchlorid.

Prinzip der Methode. Das Kaliumplatinchlorid ist in absolutem Alkohol unlöslich, während das entsprechende Natriumsalz löslich ist. Chlornatrium ist in absolutem Alkohol unlöslich, daher ist es auch notwendig, daß sowohl Kalium als Natrium in Form von Chlorplatinat vorhanden sind, da anderenfalls das erhaltene Kaliumplatinchlorid mit Natriumchlorid verunreinigt und der Kaliumgehalt zu hoch ausfallen würde.

Bei der Berechnung der anzuwendenden Menge Platinchloridlösung geht man von folgender Überlegung aus: Unter der Annahme, die Summe der Chloride p bestehe ganz aus Chlornatrium, läßt sich die nötige Menge Chlorplatinsäure zu seiner Verwandlung in Chloroplatinat nach folgender Proportion berechnen.

$$2 \text{ NaCl} : \text{Pt} = p : x$$

$$x = \frac{\text{Pt}}{2 \cdot \text{NaCl}} \cdot p = \text{Gramm Platin aus Chloroplatinsäure.}$$

Bei 10prozentiger Chlorplatinsäure ist:

$$10 \text{ g Platin} : 100 \text{ ccm} = \frac{\text{Pt}}{2 \cdot \text{NaCl}} p : x$$

$$x = \frac{\text{Pt} \cdot 10}{2 \cdot \text{NaCl}} \cdot p = \text{Kubikzentimeter H}_2 (\text{PtCl}_6).$$

Man versetzt die Chloride in einer Porzellan- oder Platinschale mit einigen Zehntel Kubikzentimeter mehr Chlorplatinsäure als berechnet und verdampft bei möglichst niedriger Temperatur auf dem Wasserbade fast zur Trockne ein, versetzt nach dem Erkalten mit wenigen Kubikzentimetern absoluten Alkohols, besser Methylalkohols, zerdrückt die Salzmasse mit einem Glasstab oder Platinspatel zu einem feinen Pulver, dekantiert durch ein mit Alkohol benetztes Filter und

wiederholt das Behandeln des Salzgemisches mit Alkohol. Zerdrücken mit dem Glasstab und Dekantieren, bis der Alkohol vollkommen farblos durch das Filter läuft und das zurückgebliebene Salz eine rein goldgelbe Farbe annimmt und keine orangegefärbten Punkte von Natriumplatinchlorid mehr enthält. Nun spült man den Niederschlag quantitativ auf das Filter, läßt den Alkohol vollständig abtropfen und trocknet einige Stunden bei 150—160° C.

Die Menge Chlorkalium erhält man aus dem Gewicht des Kaliumplatinchlorids durch Multiplikation mit 0,30712, die Menge Kalium durch Multiplikation mit dem Faktor 0,1612, die des Kaliumoxyds mit dem Faktor 0,1914. Die Menge Chlornatrium erhält man durch Subtraktion des ermittelten Wertes für Chlorkalium von der Gesamtmenge der Chloride.

Trennung des Kaliums vom Natrium nach der Perchloratmethode von Schlösing-Wense ¹⁾.

Das Prinzip der Methode beruht auf der Unlöslichkeit des Kaliumperchlorats und der Löslichkeit des Natriumperchlorats in perchlorsäurehaltigem 97prozentigen Alkohol.

Die Chloride (Sulfate dürfen wegen der Unlöslichkeit des Natriumsulfats in Alkohol nicht anwesend sein) werden in 20 ccm heißen Wassers gelöst, mit der 1½fachen Menge Perchlorsäurelösung versetzt, unter Umrühren zur Sirupkonsistenz verdampft, bis alle Salzsäure entwichen ist und schwere Dämpfe von Perchlorsäure auftreten. Hierauf setzt man ein wenig heißes Wasser zu und verdampft unter häufigem Umrühren und Ersatz der sich verflüchtigenden Perchlorsäure. Nach dem Erkalten behandelt man mit 20 ccm 97prozentigen Alkohols, dem man 0,2 Gewichtsprocente Perchlorsäure zufügt, rührt stark um, ohne jedoch die Kristalle des Kaliumperchlorats in ein allzu feines Pulver, das dann leicht durch das Asbestfilter hindurchgeht, zu verwandeln und läßt absitzen. Man dekantiert den Niederschlag durch einen Goochtiiegel, behandelt den Rückstand nochmals mit Waschalkohol, vertreibt den Alkohol, nachdem man die Hauptmenge durch den Goochtiiegel abgossen hat, durch gelindes Erwärmen, löst in 10 ccm heißen Wassers, dem man etwas Perchlorsäure zusetzt, und verdampft unter Umrühren, bis Dämpfe von Perchlorsäure auftreten. Hierauf fügt man 1 ccm Waschalkohol hinzu, bringt das Kaliumperchlorat mittels einer Gummifahne in den Goochtiiegel, wäscht mit etwas reinem 97prozentigen Alkohol aus, trocknet bei 130° C und wägt. 1 mg Kaliumperchlorat entspricht 0,1 Proz. Kaliumchlorid bzw. 0,0632 Proz. Kali.

2. Schwermetalle.

Nachweis.

Zum Nachweis der Gegenwart von Schwermetallen leitet man in eine Probe der salzsauren Lösung Schwefelwasserstoff ein oder setzt Schwefelwasserstoff-

¹⁾ Schlösing-Wense, Zeitschr. f. angew. Chemie 1891, 691 und 1892 233.

wasser hinzu, wobei ein schwarzer Niederschlag von Metallsulfiden auf die Anwesenheit von Schwermetallen deutet. In einem Öle oder Fette wird der Nachweis in der Weise erbracht, daß man das Fett in einem Kolben mit sehr verdünnter Salpetersäure auf dem Wasserbade erwärmt, wobei die Metalle in die saure Lösung gehen; oder man löst einfach die Asche in Salpetersäure und verdünnt die Lösung mit Wasser. Einen Teil dieser Lösung versetzt man mit Schwefelwasserstoff; entsteht ein schwarzer oder brauner Niederschlag, so deutet das auf die Gegenwart eines Schwermetalles. Entsteht kein Niederschlag, so wird ein anderer Teil der Lösung mit Ammoniak neutralisiert und mit Ammoniumsulfid versetzt. Versetzt man einen Teil der Lösung mit Kaliumferrozyanid oder mit Ammoniak, so entsteht in Gegenwart von Kupfer ein brauner Niederschlag resp. eine blaue Färbung. Bei Gegenwart von Blei entsteht mit Schwefelsäure ein weißer Niederschlag, mit Kaliumchromat ein gelber, in Kalilauge löslicher Niederschlag. Die Speiseöle und Speisefette enthalten oft Kupfer und Blei, weil diese Metalle von den ranzigen Fetten aus den Gefäßen leicht gelöst werden.

a) Eisen.

Nachweis. Versetzt man die schwachsaure, salzsaure Aschelösung mit einigen Kubikzentimetern Rhodankaliumlösung, so färbt sich die Lösung in Gegenwart von Eisen rot.

Man kocht eine Probe der salzsauren Aschelösung mit etwas Salpetersäure und versetzt mit einer Ferrozyankaliumlösung, so entsteht eine Blaufärbung, die bei größeren Eisenmengen in einen flockigen blauen Niederschlag übergeht.

In Fetten oder Ölen weist man das Eisen in der Weise nach, daß man das betreffende Öl oder Fett in einem graduierten Zylinder mit schwefelsäurehaltigem Wasser schüttelt, dann einige Tropfen Kaliumferrozyanid und Äther hinzusetzt und schüttelt wieder. Das Öl löst sich in Äther und das Gemisch trennt sich in zwei Schichten, zwischen denen sich bei Gegenwart von Eisen eine mehr oder weniger dicke Schicht von Berlinerblau bildet. Verwendet man bekannte Mengen Öl, Wasser, Säure und Kaliumferrozyanid, so lassen sich annähernde quantitative Bestimmungen durch vergleichende Versuche ausführen.

Quantitative Bestimmung.

Die salmiakhaltige Eisenlösung wird in einem Becherglase auf 70° C erhitzt, mit Ammoniak im geringen Überschuß gefällt, filtriert, der Niederschlag auf dem Filter mit heißem Wasser gewaschen und getrocknet. Hierauf verbrennt man den Niederschlag im Platintiegel, erhitzt allmählich im bedeckten und dann im halbverdeckten Tiegel über halbaufgedrehtem Teclubrenner, weil Fe_2O_3 beim starken Erhitzen im Gebläse in $3 \text{ Fe}_3\text{O}_4$ übergeht, wodurch die Werte zu niedrig ausfallen. Das so erhaltene Fe_2O_3 hat ein verschiedenes Aussehen: schwachgeglühtes ist rotbraun, starkgeglühtes ist graphitfarbig. Beide sind in verdünnter Salzsäure sehr schwer löslich, lösen sich aber bei der Digestion mit konzentrierter Salzsäure auf dem Wasserbade.

Jodometrische Bestimmung des Eisens nach Neumann.

Dieses Verfahren gestattet, sehr geringe Mengen zu bestimmen. Sein Prinzip beruht darauf, daß eine schwefelsaure Lösung von Zinksulfat und viel phosphorsaurem Natrium schwach ammoniakalisch gemacht, in der Hitze alles Zink als Zinkammoniumphosphat ausscheidet. Enthält die Lösung nicht zu große Mengen von Eisenoxyd,

so wird auch dieses gefällt. Durch das so abgeschiedene Eisenoxyd werden nach dem Lösen in Salzsäure aus Jodkalium äquivalente Mengen Jod freigemacht, die nach Zusatz von Stärkelösung mit n/250-Natriumthiosulfatlösung gemessen werden.

Erforderliche Lösungen. 1. Eisenchloridlösung. Zur Bereitung dieser Lösung benutzt man 20 ccm der 10 g Fe im Liter enthaltenden Fresenius'schen Eisenchloridlösung, versetzt mit 2 ccm konzentrierter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 und füllt mit destillierten Wasser zum Liter auf.

2. $\frac{2}{250}$ Natriumthiosulfatlösung. Diese Lösung enthält 1 g Natriumthiosulfat und 1 g Ammoniumkarbonat im Liter Wasser.

3. Zinkreagens. Man löst 25 g Zinksulfat und 100 g Natriumphosphat jedes für sich in Wasser und gießt beide Lösungen zusammen. Der dabei entstehende Niederschlag von Zinkphosphat wird mit verdünnter Schwefelsäure bis zur Lösung versetzt und mit Wasser zum Liter aufgefüllt.

Stärkelösung. Man löst 1 g löslicher Stärke in etwa $\frac{1}{2}$ Liter kochenden Wassers und kocht bis zum vollständigen Klarwerden der Flüssigkeit.

Titerstellung. Der Titer der Thiosulfatlösung muß bei jeder Bestimmung wieder gestellt werden. Zu diesem Zweck verdünnt man 10 ccm der Eisenchloridlösung in einem Kolben mit Wasser, versetzt mit einigen Tropfen Stärkelösung, fügt etwa 1 g Kaliumjodid hinzu auf etwa 50—60° C erwärmt und läßt aus der Bürette soviel Natriumthiosulfatlösung tropfenweise hinzufließen, bis die dunkelblaue Farbe über rotviolett gerade verschwindet. Die so verbrauchte Anzahl Kubikzentimeter Natriumthiosulfat entsprechen genau 2 mg Fe.

Ausführung der Bestimmung. Nachdem die Aschenlösung im Rundkolben mit etwas Wasser gekocht hat, wird sie vollständig kalt mit 20 ccm Zinkreagens (sind ausreichend für 5—6 mg Fe) versetzt und unter fortwährendem Kühlen mit soviel Ammoniak versetzt, bis der weiße Niederschlag des Zinkphosphats nicht mehr verschwindet und fügt dann soviel Ammoniak hinzu, bis der Niederschlag eben in Lösung geht. Dann erhitzt man den Kolben im Babobloch, wobei nach einigem Sieden eine weiße kristallinische Trübung eintritt, und erhitzt weitere 10 Minuten, wobei es sich empfiehlt, den Kolben mit einem Steigrohr zu versehen, um Herausschleudern der Flüssigkeit zu verhindern (Glikin). Der abgeschiedene Niederschlag wird noch heiß durch ein kleines quantitatives Filter gegossen und eine Probe der ablaufenden Flüssigkeit sofort mit Salzsäure und Rhodankalium auf die Gegenwart geprüft. Färbt sich das Filtrat noch rot, so bringt man die Probe in den Kolben zurück, kocht weiter und prüft nochmals. Nachdem man den Niederschlag dreimal mit heißem Wasser dekantiert hat, bringt man ihn mittels heißer Salzsäure in einen Kolben und spült das Filter fünfmal mit heißer Salzsäure und dann mit heißem Wasser nach, bis das Waschwasser keine Reaktion mit Salzsäure und Rhodankali gibt. Nun neutralisiert man die Eisenlösung im Kolben mit Ammoniak, bis die Trübung gerade eintritt und fügt tropfenweise (je 10 Tropfen) Salzsäure hinzu, bis sie gerade verschwindet und titriert, wie es bei der Titerstellung angegeben ist. Erfordern 10 ccm der Eisenlösung (= 2 mg Fe) 9,2 ccm Natriumthiosulfatlösung und

sind bei der Haupttitration 12,5 ccm der Thiosulfatlösung, so erhält man nach der Proportion $9,2 : 2 = 12,5; x = 2,72 \text{ mg Fe}$.

Enthält die zu untersuchende Substanz wenig Eisen, so füge man 10 ccm der Eisenlösung hinzu und ziehe vom Gesamtergebnis die diesem entsprechende Anzahl Kubikzentimeter Natriumthiosulfat ab.

b) Mangan.

Nachweis. Die schwefelsaure Lösung der Asche wird gekocht, bis alle Kohlensäure, Salzsäure vertrieben ist und das Mangan in Lösung gegangen ist. Diese Lösung bringt man in ein mit Bleisuperoxyd und Salpetersäure beschicktes Reagensglas und erhitzt; dann färbt sich die Lösung schön violettrot.

Bestimmung des Mangans. Die salzsaure Eisenchloridlösung verdünnt man auf 500 ccm und neutralisiert sie in einer Schale unter Umrühren mit Natriumkarbonatlösung bis zum Ausscheiden eines Niederschlages, den man mit Salzsäure löst, die rotbraune Lösung mit Natriumazetat versetzt, schnell aufkocht, den Niederschlag absetzen läßt und mit heißem Wasser auswäscht. Das Filtrat versetzt man nach dem Erkalten wieder mit Natriumkarbonat, bis eben eine schwache Fällung entsteht, die man mit schwacher Essigsäure bis zur Lösung versetzt und diese zum Sieden erhitzt und mit Bromwasser versetzt. Der noch etwas Chlorkalzium enthaltende Niederschlag wird abfiltriert, in dasselbe Becherglas, in dem es gefällt war, hinübergespitzt, der Rest mit etwas heißer, schweflige Säure enthaltender konzentrierter Salzsäure in das Becherglas, in das man filtriert, nachgespült. Die Lösung wird mit einigen Kubikzentimetern Wasserstoffsuperoxyd versetzt, ammoniakalisch gemacht und solange erhitzt, als noch Gasentwicklung stattfindet. Der nun ausfallende Niederschlag wird abfiltriert, mit heißem Wasser gewaschen, nach dem Verbrennen des Filters bis zur Gewichtskonstanz geglüht und als Manganoxyduloxyd Mn_3O_4 in Rechnung gesetzt. $100 \text{ Teile } \text{Mn}_3\text{O}_4 = 72,05 \text{ MnO} = 93 \text{ MnO}$.

c) Aluminium.

Nachweis. Zum Nachweis des Aluminiums versetzt man die Aschenlösung mit Schwefelsäure und fällt die Erdalkalien mit Alkohol. Der Alkohol wird hierauf durch Kochen verjagt und die Lösung mit Ammoniak versetzt, wodurch Eisen, Aluminium und Magnesium ausfallen. Man kocht darauf den Niederschlag mit viel Barytwasser, wodurch Aluminium in Lösung geht, das man durch Chlorammonium fällt und nachweist.

Eisen, Aluminium und Mangan weist man nach, indem man die salzsaure Aschenlösung mit konzentrierter Salpetersäure kocht, mit Ammoniak und Ammoniumchlorid versetzt, wodurch sich ein Niederschlag aus Aluminium und Eisen als Phosphate und Hydroxyde bildet. Man löst nun den Niederschlag in Salzsäure und fällt das Eisen mit Natriumhydroxyd. In dem so erhaltenen Niederschlage weist man mit Rhodankalium oder der Berlinerblaureaktion Eisen nach, filtriert dann, übersättigt mit Salzsäure, macht mit Ammoniak wieder alkalisch und kocht. Die Gegenwart des Aluminiums erkennt man an der Trübung oder dem Niederschlag.

Quantitative Bestimmung. Nachdem man das Aluminium und Eisen (s. oben) mit Ammoniak und Ammoniumchlorid als Phos-

phate gefällt und den Niederschlag sorgfältig ausgewaschen hat, spritzt man ihn mit Salzsäure in eine Porzellanschale ab, versetzt mit reiner Kaliumhydroxylösung bis zur stark alkalischen Reaktion, kocht und verdünnt mit heißem Wasser, wodurch ein Niederschlag ausfällt, der das Eisen enthält, während Aluminium als Aluminat in Lösung geht. Nach Wiederholung der Eisenfällung wird die Aluminiumlösung mit Salzsäure angesäuert, bis zum Sieden erhitzt und durch Übersättigen mit Ammoniak gefällt, der Niederschlag nach dem Waschen mit dem Filter verbrannt, geglüht, erkalten gelassen und als Al_2O_3 gewogen. 100 Teile $\text{Al}_2\text{O}_3 = 52,94$ Teile Al.

d) Kupfer.

Nachweis. Versetzt man die blaue oder bläulichsaure Aschenlösung mit Ammoniak und Ammoniumkarbonat, so bildet sich zuerst ein bläulicher Niederschlag, der durch einen Überschuß von Ammoniak mit tiefblauer Farbe des Kupferoxydammoniaks in Lösung geht. Auch durch die sogenannte „umgekehrte“ Trommersche Probe läßt sich das Kupfer nachweisen, und zwar erhitzt man eine blaue Kupfersalzlösung mit Kaliumhydrat und Traubenzucker, so entsteht rotes oder braunes Kupferoxydul.

Quantitative Bestimmung. Man verascht 10—20 g Substanz in einer Platinschale, löst den Rückstand in Wasser unter Zufügung von einigen Tropfen Salpetersäure und filtriert. Das Filtrat wird bis auf etwa 100°C erhitzt, mit reiner Natron- oder Kalilauge versetzt und einige Minuten wieder erhitzt, wobei sich ein schwarzer Niederschlag von Kupferoxyd ausscheidet. Der Niederschlag wird abfiltriert, geglüht und gewogen.

Fette erwärmt man unter Umrühren mit Salzsäure, läßt erkalten, filtriert durch ein feuchtes Filter und wäscht wiederholt mit kaltem Wasser nach. Man dampft dann das Filtrat ein und leitet in die heiße Lösung einen Strom von Schwefelwasserstoff, wobei sich Kupfersulfid ausscheidet. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit schwefelwasserstoffhaltigem Wasser ausgewaschen, getrocknet und mit Schwefel in einem Porzellantiegel im Wasserstoffstrome geglüht. Der Rückstand besteht aus Kupfersulfür Cu_2S .

Fresenius und Schattenfroh lösen in einem Kolben eine gewogene Menge Öl oder Fett in der vierfachen Menge Äther auf, säuern mit Salzsäure an, fügen Schwefelwasserstoffwasser zu und schütteln den mit einem Kautschukstöpsel verschlossenen Kolben durch und lassen Absetzen. Hierauf gießt man den größten Teil der Ätherschicht ab und filtriert die wässrige Lösung durch ein feuchtes Filter. Auf dem Filter bleibt eine geringe Menge Öl und Äther, die durch das dann mit Äther befeuchtete Filter gut hindurchgeht. Das Kupferchlorür wird mit Äther gewaschen und gewogen.

e) Bestimmung des Bleies.

Man verascht in einer Platinschale etwa 10—20 g Fett, löst den Rückstand in verdünnter Salpetersäure, versetzt dann mit verdünnter

Schwefelsäure, und dampft auf dem Wasserbade ein, um die Salpetersäure zu verjagen. Hierauf wird die Lösung mit etwas Wasser verdünnt, mit dem doppelten Volumen starken Alkohols versetzt und einige Stunden stehen gelassen. Hierauf filtriert man das ausgeschiedene Bleisulfat ab, wäscht mit verdünntem Alkohol aus, trocknet und glüht, wobei das Filter besonders verbrannt werden muß.

3. Saure Bestandteile der Asche.

a) Kohlensäure.

Nachweis. Man übergießt eine Probe der Asche mit Salz- oder Schwefelsäure; es entweicht ein farb- und geruchloses Gas, das, in Barytwasser geleitet, einen weißen Niederschlag von Bariumkarbonat hervorruft.

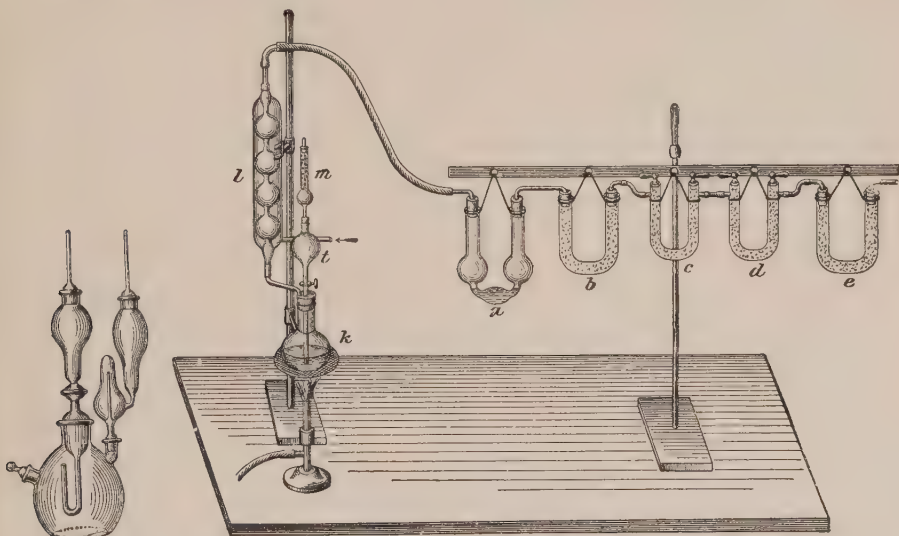


Fig. 23.

Fig. 24.

Quantitative Bestimmung. Da die meisten Aschen, wie bereits erwähnt, noch Kohlensäure enthalten, die aus organischen Salzen entstanden sind und daher der Asche abgezogen werden müssen, so geht diesen Bestimmungen stets eine Bestimmung der Kohlensäure, der noch vorhandenen Kohle und der Kieselsäure voraus.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß die Kohlensäure in besonders für die Zwecke konstruierten Apparaten durch eine andere Säure, Salzsäure oder Schwefelsäure verdrängt und ihre Menge aus dem Gewichtsverlust ermittelt wird oder indem man die verdrängte Kohlensäure von Kalilauge oder Natronkalk absorbieren läßt und deren Gewichtszunahme bestimmt.

Man wägt den leeren Apparat (Fig. 23), bringt durch die Seitenöffnung etwa 1 g gut durchgemischter Asche hinein und wägt wieder, läßt durch Lüften des Gashahnes oder Stöpsels die Säure zufließen,

schließt und wartet die Kohlensäureentwicklung ab. Gegen Ende der Entwicklung erwärmt man gelinde und entfernt die noch vorhandene Kohlensäure durch Evakuieren oder durch einen trockenen langsamen, kohlensäurefreien Luftstrom.

Genauer, wenn auch umständlicher gestaltet sich die Bestimmung der Kohlensäure im nebenabgebildeten Apparat. Die Peligotsche Röhre *a* ist mit etwa 20 cem konzentrierter Schwefelsäure gefüllt, die Röhre *b* enthält Chlorkalzium, die zur Aufnahme der Kohlensäure dienende Röhre *c* und *d* sind mit Natronkalk gefüllt und endlich *e* zur Hälfte mit Chlorkalzium und Natronkalk. Nachdem man die Röhren *c* und *d* gewogen und die Verbindungen des Apparates hergestellt hat, bringt man die gewogene Asche in den Kolben *k*, der mit einer kleinen Flamme gewärmt wird, läßt durch das Trichterrohr *t* die verdünnte Säure zufließen und beobachtet die Gasentwicklung im Rohre *a*. Sobald die Gasentwicklung nachgelassen hat, entfernt man die Flamme, verbindet mit einem Aspirator, öffnet den Hahn *t* und leitet bei kleiner Flamme einen schwachen Luftstrom durch, bis alle Kohlensäure aus dem Apparate entfernt ist ($\frac{1}{2}$ Stunde). Aus der Gewichtszunahme der Röhre *c* und *d* erfährt man die Menge Kohlensäure (Fig. 24).

b) Chlorwasserstoffsäure.

Nachweis. Die salpetersaure Lösung der Asche (s. quantitative Bestimmung) wird mit salpetersaurem Silber versetzt, wodurch ein weißer, käsiger Niederschlag entsteht, der auf die Gegenwart von Chlor deutet.

Quantitative Bestimmung. Man verkohlt 10—15 g Substanz unter Zusatz von reinem Natriumkarbonat oder Natriumkarbonat und Natriumnitrat (1 : 2), die Kohle extrahiert man mit heißem Wasser, dem man 2—3 Tropfen Salpetersäure hinzusetzt, bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion unter gleichzeitiger Filtration. Das Filtrat wird auf dem Wasserbade, nicht aber bei saurer Reaktion, eingeeengt, nach dem Erkalten mit Salpetersäure versetzt, bis alle Kohlensäure entwichen ist, und mit einer 10prozentigen Silbernitratlösung in verdünnter Salpetersäure versetzt, solange noch ein Niederschlag entsteht und auf dem Wasserbade erwärmt, damit er sich grobflockig absetzt. Der getrocknete Niederschlag wird auf Glanzpapier gebracht, das Filter im Tiegel vorsichtig verbrannt, der aus metallischem Silber bestehende Teil wird im Tiegel in Salpetersäure gelöst, mit Salzsäure gefällt, die Säuren auf dem Wasserbade verjagt und das Chlorsilber vom Papier in den Tiegel gebracht. Hierauf erhitzt man, bis das Chlorsilber zusammensintert, stellt es in den Exsikkator und wägt nach dem Erkalten (s. Harn).

c) Jodwasserstoffsäure.

Nachweis. Die durch Veraschen der Substanz mit Soda und Salpetergemisch erhaltene Asche wird in heißem Wasser gelöst, filtriert, das Filtrat mit einem Überschuß von verdünnter Schwefelsäure versetzt, dann etwas Schwefelkohlenstoff oder Chloroform zugefügt und gut durchgeschüttelt, wobei das in

Freiheit gesetzte Jod in das Lösungsmittel mit intensiv blauvioletter Farbe übergeht.

Quantitative Bestimmung. Man verfährt in der Weise, daß man die erkaltete Aschenlösung in einem Scheidetrichter mit Natriumnitritlösung und Schwefelsäure versetzt, kräftig durchschüttelt und die Chloroformschicht nach dem Absetzen abläßt. Diese Operation wird so oft wiederholt, bis sich kein Jod mehr ausscheidet; die vereinigten Auszüge werden filtriert, in ein Kölbchen mit einer genügenden Menge 10prozentiger Kaliumjodidlösung gebracht und das Chloroform durch einen mäßigen Luftstrom verjagt, wobei das freigewordene Jod von der Jodkaliumlösung aufgenommen wird. In der so erhaltenen Lösung wird das Jod durch Filtration mit $\frac{1}{10}$ Normalthiosulfatlösung bestimmt.

Bei größeren Jodmengen kann man auch gewichtsanalytisch verfahren, indem man das nach dem Verdunsten des Chloroforms in der Jodkaliumlösung zurückgebliebene Jod mit einer verdünnten Lösung von Silbernitrat in $\frac{1}{2}$ Volumen Wasser und 4 Volumen Alkohol versetzt, wodurch Silberjodid ausfällt, das man durch ein getrocknetes und gewogenes, gehärtetes Filter filtriert, mit etwas Wasser und Alkohol auswäscht und nach dem Trocknen wägt.

Diese Methode kann auch zur Trennung des Jodes vom Chlor und Brom dienen, da das Silberjodid in Ammoniak unlöslich ist (Glikin).

d) Bromwasserstoff.

Das Brom weist man nach, indem man die Substanz in derselben Weise wie bei Jod behandelt, in die saure Lösung Chlorgas einleitet und mit Chloroform oder Schwefelkohlenstoff schüttelt, wodurch eine Braunfärbung von dem in Lösung gehenden Brom entsteht.

e) Fluorwasserstoff.

Zum Unterschied von den übrigen Halogenen gibt Fluor keinen Niederschlag mit Silbernitrat. Man weist das Fluor am sichersten nach, indem man die zu untersuchende Substanz im Platintiegel mit konzentrierter Schwefelsäure zerstört und die Ätzprobe an einem auf dem Platingeß liegenden, mit Wachs überzogenen Uhrglas vornimmt. Die in das Wachs gezeichneten Schriftzüge erscheinen nach dem Reinigen des Glases vom Wachs ganz deutlich.

f) Bestimmung der Schwefelsäure.

Man verascht 15—20 g Substanz unter Zusatz eines Gemisches von 1 Teil Salpeter und 2 Teilen Soda. Die so erhaltene Schmelze behandelt man nach dem Erkalten in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade mit kochendem Wasser unter Zusatz von Salzsäure, um die Kieselsäure abzuscheiden. Die von der Kieselsäure abfiltrierte, schwach salzsaure Flüssigkeit wird zum Sieden erhitzt und mit heißer

Bariumchloridlösung versetzt, wodurch sich ein Niederschlag von Bariumsulfat abscheidet, den man nach dem Auswaschen mit heißem Wasser trocknet, im Platintiegel verbrennt und bis zur Gewichtskonstanz glüht und dann wägt.

g) Bestimmung der Phosphorsäure.

Zur Bestimmung der Phosphorsäure verascht man die Substanz entweder mit einem Gemisch von Soda und Salpeter (2 : 1) oder mit dem Säuregemisch nach Neumann. Beim trockenen Veraschen muß der Umstand beachtet werden, daß die Aschen oft die Phosphorsäure in Form von Pyrophosphorsäure enthalten, die nicht durch Molybdänlösung gefällt werden, und man erhitzt daher bei Aschen die sauren Lösungen der Phosphorsäure vor der Fällung.

Fällung mit Molybdänlösung. Diese wird durch Auflösen von 150 g molybdänsaurem Ammonium in 1 Liter Wasser und 1 Liter Salpetersäure vom spezifischen Gewichte 1,2 bereitet. Wagner-Stutzer lösen 150 g molybdänsaures Ammonium in möglichst wenig Wasser, fügen 400 g Ammoniumnitrat und Wasser bis zum Liter hinzu und bringen diese Lösung in 1 Liter Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,17—1,20.

Die Schmelze löst man in Wasser unter Zusatz von verdünnter Salpetersäure, filtriert die ungelöst gebliebene Kieselsäure ab, versetzt das Filtrat mit 100 ccm der Wagnerschen Molybdänlösung auf 0,4 g Phosphor, wobei ein gelber Niederschlag von phosphormolybdänsaurem Ammon entsteht, den man nach 12stündigem Stehen bei 70—80° C abfiltriert, mit einer Flüssigkeit aus 100 ccm Molybdänlösung, 20 Teilen Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,2 und 80 Teilen Wasser oder mit einer Ammoniumnitratlösung unter Zusatz von etwas Salpetersäure auswäscht und in verdünntem Ammoniak löst. Die ammoniakalische Lösung wird mit Salzsäure vorsichtig neutralisiert und mit Magnesiamixtur (eine Lösung von 550 g kristallisiertem Chlormagnesium und 700 g Ammoniumchlorid in 6,5 Liter Wasser wird mit 8prozentiger Ammoniaklösung zu 10 Liter aufgefüllt und nach mehrtägigem Stehen filtriert) bei gewöhnlicher Temperatur tropfenweise versetzt, wobei sich die Phosphorsäure in Form von Ammoniummagnesiumphosphat ausscheidet. Dieses wird nun abfiltriert, mit ammoniakhaltigem Wasser nachgewaschen, getrocknet, das Filter für sich im Platintiegel verkohlt, die Hauptmasse des Niederschlages in den Tiegel gebracht, erhitzt und dann im Gebläse bis zur Gewichtskonstanz geglüht, d. h. bis reines Magnesiumpyrophosphat zurückbleibt.

Zitratmethode. Nach den Vorschriften der Deutschen Versuchstationen versetzt man 50 ccm der wässerigen salz-, salpeter- oder schwefelsauren Lösung = 0,1—0,2 g Phosphorsäure, mit 20 ccm Zitratlösung, bestehend aus einer Lösung von 500 g Zitronensäure im Liter Wasser, neutralisiert die Lösung nahezu mit 10prozentigem Ammoniak, fügt nach dem Erkalten 25 ccm Magnesiamixtur bis zum Eintreten einer Trübung hinzu, versetzt mit einem Drittel Volumen 10prozentigen Ammoniaks, rührt um und läßt 12 Stunden

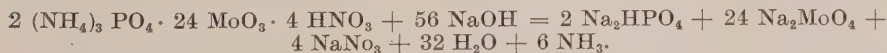
stehen. Hierauf filtriert man, wäscht mit 2prozentigem Ammoniak nach, glüht und wägt.

Bestimmung als Ammoniumphosphormolybdat. Man verdünnt 40 ccm Lösung, in der 0,1 g P_2O_5 enthalten sind, auf 50 ccm, fügt zur Flüssigkeit 30 ccm einer 70 g Ammoniumnitrat in 200 g Wasser enthaltenden Lösung und erhitzt zum Sieden. Die kochende Lösung versetzt man in dünnem Strahl mit 200 ccm einer kochenden, 30 g im Liter enthaltenden Ammoniummolybdatlösung, indem man das erste Becherglas mit einem durchbohrten Uhrglas bedeckt, durch dessen Öffnung ein aus einem Reagensglas hergestellter Trichter steckt. Nachdem sich der Niederschlag abgesetzt hat, gießt man durch ein 7 cm-Filter und dekantiert mit 50 ccm einer Lösung, die aus 100 ccm der Ammoniumnitratlösung, 100 ccm 25prozentiger Salpetersäure und 150 ccm Wasser besteht. Hierauf löst man den Niederschlag des Phosphormolybdats im Becherglase durch Zufließenlassen von 10 ccm 8prozentigen Ammoniaks, wäscht mit 30 ccm Wasser nach, fügt 20 ccm der Ammoniumnitratlösung und 1 ccm Ammoniummolybdatlösung, erhitzt zum Sieden und fällt das Ammoniumphosphormolybdat durch Zufließenlassen von 20 ccm heißer 25prozentiger Salpetersäure. Am nächsten Tage wird der Niederschlag in einen Goochtiegel übergeführt, mit der heißen Waschflüssigkeit ausgewaschen, solange das ablaufende Filtrat mit Kaliumferrozyanidlösung noch braun gefärbt wird. Das Phosphormolybdat glüht man bis zur einheitlichen schwarzen Farbe; es enthält 3,145 Proz. P_2O_5 . Unter Benutzung dieses empirischen Faktors ist die in 25 ccm der gegebenen Lösung vorhandene Menge P_2O_5 zu berechnen.

Alkalimetrische Bestimmung des Phosphors nach Neumann.

Ein sicheres und schnelleres Verfahren ist das von Neumann¹⁾ ausgearbeitete. Sein Hauptvorteil besteht in der Möglichkeit, die Substanz ohne vorheriges, mit Verlust an organischem Phosphor verbundenes Verkohlen, direkt mittels eines Gemisches von gleichen Teilen konzentrierter Schwefelsäure und Salpetersäure zu zerstören und sämtlichen organischen Phosphor zu Phosphorsäure zu oxydieren. Diese Methode gibt auch bei sehr geringen Mengen genaue Werte.

Das Prinzip dieser Methode besteht im wesentlichen darin, daß der nach angegebener Vorschrift erzeugte Ammoniumphosphormolybdatniederschlag von der Zusammensetzung $2 (NH_4)_3PO_4 \cdot 24 MoO_3 \cdot 4 HNO_3$ durch Natronlauge im Sinne folgender Gleichung zerlegt wird.



Wird nun das so entstandene Ammoniak durch Kochen mit einem Überschuß von titrierter Natronlauge entfernt, so läßt sich unter Benutzung von Phenolphthalein als Indikator durch Säure zurücktitrieren und sehr genau bestimmen, wieviel Natronlauge zur vollständigen Neutralisation des Niederschlages erforderlich ist. Titriert man mit halbnormalen Lösungen, so entspricht jedem Kubikzentimeter NaOH 1,268 mg P_2O_5 , denn 56 Mol. Natronlauge entsprechen 1 Mol. P_2O_5 , folglich entsprechen 56 Liter n-Natronlauge 142 g P_2O_5 , oder 1 ccm n/2 NaOH 1,268 mg P_2O_5 .

¹⁾ Neumann, Zeitschr. f. physiol. Chemie **37**, 129 (1902); **43**, 35 (1904).

Erforderliche Lösungen. 1) 50prozentige Ammoniumnitratlösung. 2) 10prozentige Ammoniummolybdatlösung. 3) $n/2$ Natronlauge und $n/2$ Schwefelsäure. 4) 1prozentige alkoholische Phenolphthaleinlösung. 5) Ein Gemisch aus gleichen Teilen konzentrierter Schwefelsäure vom spezifischen Gewicht 1,84 und konzentrierter Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,4.

Veraschung der Substanz. Die zu untersuchende Substanz, sei es eine trockene oder feuchte, selbst Flüssigkeiten werden direkt im Kolben oder nach vorherigem Eindunsten mit dem Säuregemisch in der unten angegebenen Weise nach der sog. Veraschung auf nassem Wege verascht. Nach diesem Verfahren wird die Substanz eigentlich nicht verascht, sondern mittels eines kräftig wirkenden Oxydationsgemisches aus gleichen Teilen Salpetersäure (1,4) und Schwefelsäure (1,84) zerstört, wobei eine Verkohlung durch langsames Hinzufügen des Säuregemisches vermieden wird.

Die Veraschung oder Oxydation wird in der Weise ausgeführt, daß man die zu untersuchende Substanz in einem Kjeldahlkolben oder Rundkolben mit einer gemessenen Menge (5—10 ccm) des Säuregemisches übergießt und einige Minuten stehen läßt, bis die Hauptreaktion, die Entwicklung der Nitrosodämpfe nachgelassen hat. Da Fett resp. Öl nicht immer unmittelbar, sondern in Form einer alkoholischen, ätherischen oder anderen Lösung in den Kolben gebracht wird, so muß vor dem Zusatz des Säuregemisches das Lösungsmittel zuerst vollständig abgedampft und der Kolben abgekühlt werden, um eine Explosion zu vermeiden. Hierauf erwärmt man den Kolben mit einer ganz kleinen Flamme und sobald die Flüssigkeit sich zu schwärzen beginnt, läßt man aus einem an einem Stativ befestigten Tropftrichter langsam einige Tropfen hinzufließen und erhitzt weiter, bis sich die Flüssigkeit wieder dunkel färbt. Diese Manipulation wird so lange wiederholt, bis die Flüssigkeit sich nicht mehr schwärzt und nach weiterem Erhitzen unter Hinzufügen von etwas Säuregemisch hellgelb oder wasserklar wird, worauf man die Flüssigkeit erkalten läßt. Diese darf sich bei erneutem Erhitzen nicht mehr färben. Die Menge des hinzugesetzten Säuregemisches darf 40 ccm nicht überschreiten.

Man kann auch im Anfang 20—25 ccm Säuregemisch hinzufügen und dann konzentrierte Salpetersäure tropfenweise hinzulassen.

Die so erhaltene wasserklare Flüssigkeit wird in einen mit einer Marke (die 150 ccm zeigt) versehenen Literkolben quantitativ übergespült, bis zur Marke mit destilliertem Wasser aufgefüllt und etwa 10 Minuten gekocht, um die braunen Dämpfe zu verjagen, die von der Zersetzung der Nitrosylschwefelsäure herrühren. Dann fügt man 50 ccm Ammoniumnitratlösung hinzu, erwärmt bis auf 70—80° C, bis gerade Blasen aufsteigen, und versetzt mit 40 ccm Ammoniummolybdatlösung, wobei ein gelber Niederschlag entsteht. Damit der Niederschlag sich möglichst körnig kristallinisch absetzt, was am Trübwerden der Flüssigkeit leicht zu erkennen ist, schüttelt man den Kolben gut durch. Hierauf läßt man den Kolben in horizontaler Lage in einen Stativring legen, wobei der Hals des Kolbens auf dem Trichterhalter

ruht (Diese Lage des Kolbens ist für das Dekantieren die bequemste) und läßt 15 Minuten stehen. (Sind mehr als 40 ccm Säuregemisch verbraucht worden, so ist die Verdünnung mit Wasser in demselben Verhältnis zu steigern und soviel Ammoniumnitratlösung hinzuzufügen, daß sie den fünften Teil des Gesamtvolumens beträgt.)

Nun dekantiert man von dem abgesetzten Niederschlag durch ein vorher mit eiskaltem Wasser gewaschenen Filter, so daß nur möglichst wenig vom Niederschlag auf das Filter kommt. Der im Kolben zurückgebliebene Niederschlag wird bis zur Marke mit eiskaltem Wasser unter Bespülung der Kolbenwände versetzt, gut durchgeschüttelt und absitzen gelassen; währenddessen füllt man ein- bis zweimal das Filter mit eiskaltem Wasser. Man dekantiert wieder und wiederholt diese Manipulation so oft, bis das ablaufende Wasser gegen Lackmus nicht mehr sauer reagiert. Hierauf bringt man das Filter in den Kolben hinein, setzt etwa 150 ccm Wasser hinzu, schüttelt gut durch, bis sich das Filter durch die ganze Flüssigkeit verteilt, fügt aus der Bürette soviel $n/2$ Natronlauge hinzu, bis sich der Niederschlag löst, d. h. die Flüssigkeit farblos wird, setzt einen Überschuß von 5—6 ccm NaOH hinzu und kocht die Lösung, bis kein Ammoniak mehr entweicht, erkennbar durch feuchtes, rotes Lackmuspapier. Nach dem Erkalten titriert man den Alkaliüberschuß unter Hinzufügung von 6—8 Tropfen Phenolphthaleinlösung mit $n/2$ Schwefelsäure zurück.

Glimmer und Bayliss empfehlen, statt Filter den Goochtiiegel anzuwenden. Das Filtrieren und Auswaschen geschieht mittels der Saugpumpe sehr schnell. Den Inhalt des Tiegels bringt man mit Hilfe eines Trichters in den Kolben zurück und verfährt weiter, wie oben angegeben ist.

Berechnung. Die Differenz zwischen der Menge der zugefügten $n/2$ Natronlauge und der verbrauchten Anzahl Kubikzentimeter $n/2$ Säure mit 1,268 multipliziert, ergibt die Menge P_2O_5 in Milligrammen oder mit 0,554 multipliziert die Menge P in Milligrammen.

XI. Bestimmung der Verbrennungswärme.

1. Wärmeeinheit.

Unter Wärmeeinheit oder Kalorie begreift man den 100. Teil jener Wärmemenge, die 1 kg Wasser vom Schmelzpunkt des Eises bis zum normalen Siedepunkt des Wassers erhitzt. Nach einer anderen Definition ist die Kalorie diejenige Wärmemenge, die von der Gewichtseinheit des Wassers absorbiert wird, indem sie sich von 0° auf 1° erwärmt. Je nachdem die Masse nach Kilogrammen oder Gramm gemessen wird, unterscheidet man große (Kilogramm-) Kalorien und kleine (Gramm-) Kalorien. Die erstere wird abgekürzt mit Cal., die letztere mit cal. bezeichnet. Diese Kalorie wird auch mittlere oder Bunsensche Kalorie genannt, weil Bunsen die mittlere spezifische Wärme des Wassers zwischen 0 und $100 = 1$ gesetzt hat.

Mit Rücksicht darauf, daß, wenn man dem Mischungskalorimeter die Temperatur 0° gibt, es sich betonen und aus der Umgebung rasch Wärme aufnehmen würde, schlug Warburg vor, einen der Zimmertemperatur naheliegenden Wärmegrad zu wählen, nämlich $15^\circ C$ — eine Temperatur, bei der auch die meisten Wärmemessungen ausgeführt werden. Als Fünfzehngradkalorie

(die auch Regnaultsche genannt wird) bezeichnet also Warburg jene Wärmemenge, die 1 g Wasser von 14,5° auf 15,5° (Wasserstoffthermometer) erwärmt. Die Bunsensche Kalorie wird als gleich groß mit der Regnaultschen angesehen.

Die Kalorie kann auf die allgemeinen Masseneinheiten zurückgeführt werden, indem man sie als Äquivalent einer gewissen mechanischen Arbeit betrachtet, die durch 426 kgm gemessen wird. Als Einheit der Arbeit (Energie) gilt das 10⁷ Erg; 1 Watt = 10⁷ Erg pro Sekunde, 1 kgm = 10⁵ · 981 Ergs, folglich ist 1 Watt = $\frac{10^7}{10^5 \cdot 981} = 0,1019$ kgm. Nun beträgt die zur Erhöhung von 1 kg Wasser um 1° notwendige Arbeitsmenge 426 kgm, oder 426 kgm Arbeit erzeugen 1000 g Kalorien, also 0,1019 kgm = 1 Watt werden demnach $\frac{1000 \cdot 1019}{426} = 0,2392$ g Kalorien erzeugen.

2. Der Untersuchungsraum.

Zur Ausführung kalorimetrischer Untersuchungen ist ein Raum erforderlich, dessen Temperatur von den Schwankungen der Außentemperatur so wenig wie möglich beeinflusst wird und dessen Wärme während der kalten Jahreszeit beliebig geregelt und gleichmäßig erhalten werden kann. Der Arbeitsraum muß von den Außenwänden durch eine Wand von der Dicke eines halben Ziegels getrennt und von großen, mit Doppelrahmen versehenen, nach Norden gelegenen Fenstern erleuchtet sein. Bei südlicher Lage der Fenster ist eine konstante Temperatur viel schwerer zu erreichen. Im Raume zwischen den Doppelrahmen muß ein Thermostat oder eine Reihe Gasbrenner aufgestellt werden, um eine Abkühlung durch die Fenster zu verhindern. Da Wasser und Luftheizung schwer zu regulieren sind, empfiehlt es sich nach Luginin¹⁾, gewöhnliche Kachelöfen zu benutzen. Der Eingang in den Arbeitsraum muß durch ein ebenso geheiztes Zimmer führen. Während des Versuches muß die Tür geschlossen sein, da das Öffnen der Tür einen Temperaturwechsel verursacht.

Stohmann hält es für zweckmäßig, den Arbeitsraum im Keller an der nach Norden gelegenen Seite zu errichten, von den anderen Räumen durch starke Wände zu trennen und mit einer Doppeltür zu versehen. Der Raum wird künstlich durch elektrische Lampen beleuchtet und durch einen kleinen Gasofen mit Thermoregulator erwärmt.

Die zur Messung der Temperaturänderungen des Kalorimeters dienenden Thermometer umfassen gewöhnlich nur einen kleinen Teil der Skala, um die Messung von hundertstel, selbst tausendstel Grad zu ermöglichen. Die Teilung wird durch Vergleichung mit den Normalthermometern hergestellt. Ihr Nullpunkt darf einige Jahre nach Fertigstellung erst bestimmt werden; weil er dann nicht so ausgedehnten Verschiebungen unterworfen ist wie der Nullpunkt der Normalthermometer, denn diese Thermometer sind nur den Schwankungen der Temperatur der Umgebung ausgesetzt.

Man benutzt gewöhnlich das bekannte Beckmannsche Thermometer, das in $\frac{1}{100}$ Grade geteilt ist. Es ist mit einem Quecksilberreservoir versehen und kann für beliebige Temperaturen eingestellt werden. Die Ablesungen geschehen mittels einer an der vertikalen Messingsäule gleitenden scharfen Lupe (man klemmt auch die Lupe am Thermometer selbst fest, damit sie ganz gerade steht), nachdem das Thermometer jedesmal durch einen leichten Schlag mittels eines mit Kautschuk überzogenen Glasstabes erschüttert worden ist, um die Adhäsion des Quecksilberfadens an der feinen Kapillarwand aufzuheben. An dunklen Tagen oder im dunklen Raum wird die Thermometerskala mittels einer elektrischen Glühlampe beleuchtet, die hinter der Milchglasskala des Thermometers an einem besonderen Stativ angebracht und verschiebbar ist. Um eine Erwärmung des Thermometers vorzubeugen, ist das Glühlämpchen in einem größeren, mit Flüssigkeit gefüllten Metallgehäuse eingeschlossen, an dessen Vorderwand ein mit Glas abgedichteter Schlitz von der Weite der Thermometerskala angebracht ist.

Jäger und Steinwehr²⁾ bedienen sich neuerdings bei der Bestimmung

¹⁾ Luginin, Bestimmung der Verbrennungswärme. Berlin 1897.

²⁾ Jäger und Steinwehr, Verhandl. d. Deutsch. phys. Gesell. 5, 353 (1903).

des Wasserwertes eines Kalorimeters zur Beobachtung des Temperaturganges in der Vor- und Nachperiode sogenannter Platinthermometer, die es ermöglichen, den Temperaturgang mit einer wesentlich größeren Genauigkeit zu messen, als die Quecksilberthermometer.

Bei kalorimetrischen Untersuchungen ist es üblich, die Temperaturerhöhung der kalorimetrischen Flüssigkeit so zu regulieren, daß sie nicht über $3\text{--}4^{\circ}$ steigt, denn eine höhere Temperatursteigerung verursacht auch einen entsprechend höheren Wärmeverlust des Kalorimeters und damit zugleich einen größeren Fehler bei der Berechnung dieses Verlustes.

3. Das Thermometer.

Ferner müssen die kalorimetrischen Bestimmungen bei einer konstanten Temperatur ausgeführt werden, weil die bei verschiedenen Temperaturen erhaltenen Werte schwer untereinander vergleichbar sind, mit Rücksicht darauf, daß die Wärmekapazität des Wassers mit der Temperatur in sehr unregelmäßiger Weise wechselt. Am geeignetsten erscheint die der mittleren Zimmertemperatur entsprechende, d. h. 18°C . Zu diesem Zweck werden die Teilungen der Thermometer von 16° bis 23° vorgenommen. Mit Rücksicht auf die Abhängigkeit der Wärmekapazität des Wassers von der Temperatur ist es wünschenswert, die Temperatur vor und zum Schluß des Versuches festzustellen.

4. Das Kalorimeter.

Das Kalorimetergefäß besteht aus einem vernickelten Messingzylinder. Um dasselbe vor dem Einfluß der Temperatur durch Bestrahlung oder Ausstrahlung zu schützen, wird es von drei durch Glasstäbe verbundenen Ebonitklötzchen getragen und steht 165 mm hoch über dem Innenboden eines zweiten leeren Messingzylinders und dieser wieder in einem großen Doppelgefäß, das mit Wasser gefüllt ist. Zwei Deckel aus starker Pappe oder Ebonit schützen das Kalorimeter nach oben. Auf dem Wasserbehälter sind drei, oben untereinander verbundene Messingsäulen befestigt, die einerseits als Stativ für die das Wasser- und das Luftthermometer haltenden Klammern und für die Lupenträger dienen sowie andererseits dazu bestimmt sind, den Bewegungsmechanismus für das im Innern des Kalorimetergefäßes befindliche Rührwerk zu tragen, durch das das Wasser während der Dauer der Beobachtung in beständiger Bewegung erhalten wird. Das Rührwerk besteht aus drei in gleichen Abständen übereinander geordneten, gelochten, ringförmigen, an einem Messingbügel befestigten Messingblechen, die eine auf- und abgehende Bewegung haben. Bei der tiefsten Stellung des Rührwerkes trifft die unterste Platte fast bis auf den Boden des Gefäßes, während die oberste, bei der höchsten Stellung des Rührwerkes bis dicht unter den Wasserspiegel kommt, ohne diesen aber ganz zu erreichen. Zur Einführung des Thermometers befindet sich an einer Stelle der beiden oberen Bleche ein entsprechender Ausschnitt. Das Rührwerk wird durch einen Elektromotor, oder eine Turbine, oder ein Uhrwerk usw. in Bewegung gesetzt.

5. Die kalorimetrische Bombe.

Der von Berthelot zur Bestimmung der Verbrennungswärme konstruierte Apparat, die sog. kalorimetrische Bombe (Fig. 26), besteht aus dem Tigel *A*, dem Deckel *B*, der Überwurfschraube *C* und dem Fuß *D*. Der große, aus einem Gußstahlblock gedrehte, mit einem starken Platinfutter ausgekleidete Tiegel *A* ruht auf einem ringförmigen, aus vernickeltem Messingblech gefertigtem Träger. Der Deckel *B* ist in seinem unteren und inneren Teile ganz aus Platin gefertigt, seine obere Platte und äußere Ansatzstücke dagegen bestehen aus Stahl. Der konische Rand des Deckels ist auf das sorgfältigste in die schwach konische Erweiterung des Tiegels eingeschliffen. Die Überwurfschraube *C* dient dazu, den Deckel fest auf dem Tigel aufzudrücken; um diese Schraube fester anziehen zu können, wird eine Stahlklaue *E* aufgesetzt und, nachdem die mit der Substanz beschickte Bombe in einen mit weichem Blei gefütterten Stahlring (Fig. 3) eingespannt ist, mittels eines Schlüssels kräftig angezogen. In dem auf den Deckel angebrachten Stahlzylinder befindet sich die Schraube *A* (Fig. 4), die das Ab-

schlußventil der Bombe bildet und zugleich zur Zuführung des Sauerstoffs sowie zum Auslassen der rückständigen Gase dient. Die Schraube ist an ihrem unteren Ende konisch abgedreht und setzt sich in eine genau entsprechende

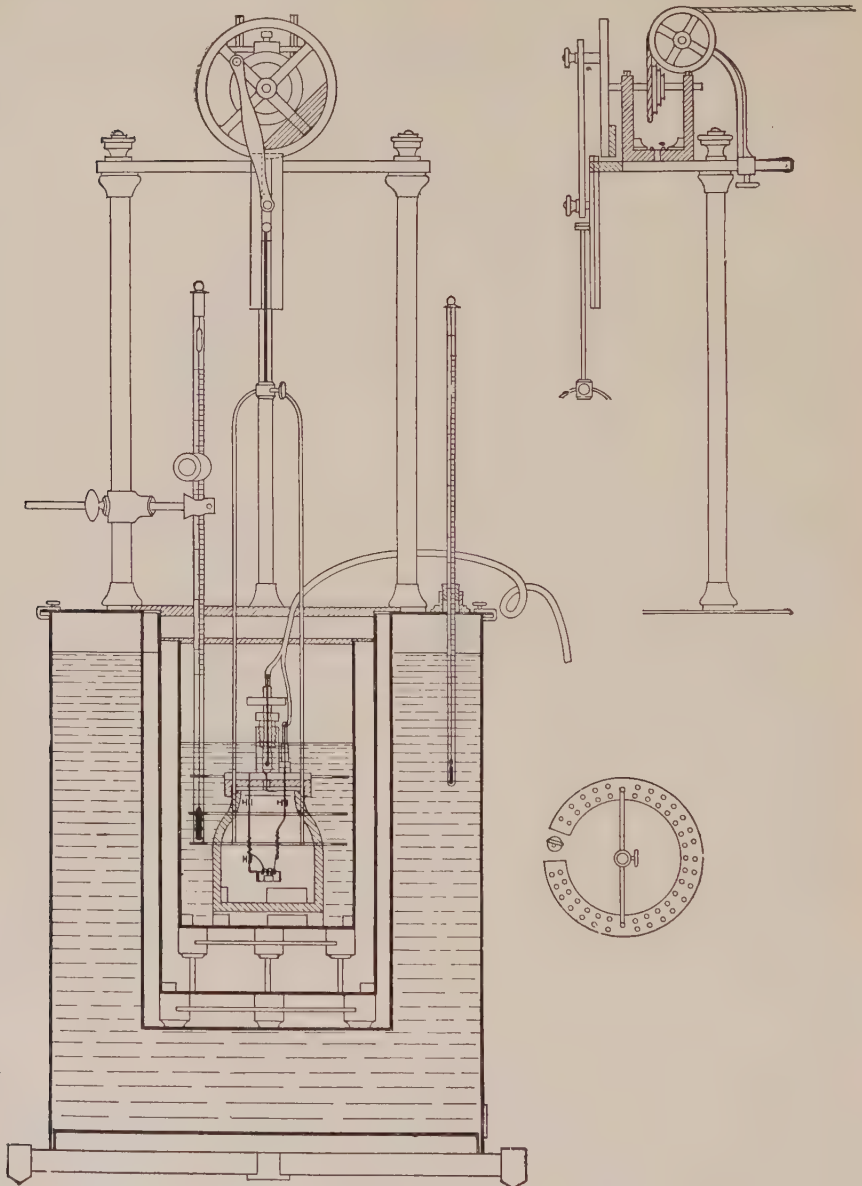


Fig. 25.
Das Kalorimeter.

konische Erweiterung eines durch den Deckel gebohrten Kanals. Ist die Bombe unter hohem Druck mit Gasen gefüllt (wie gewöhnlich nach der Verbrennung) und ist die Schraube *a* bis zum tiefsten Punkt herabgedreht, so verschließt der Konus am unteren Ende die Bombe hermetisch. Um die Bombe zu öffnen, wird die Schraube um etwa eine halbe Drehung aufwärts geschraubt, wobei

die Gase ihren Weg durch das konische Ventil, durch die dicht darüber befindliche Rinne nehmen, dann in die Röhre der Schraube treten und ins Freie entweichen. Den umgekehrten Weg nimmt der Sauerstoff beim Füllen der Bombe.

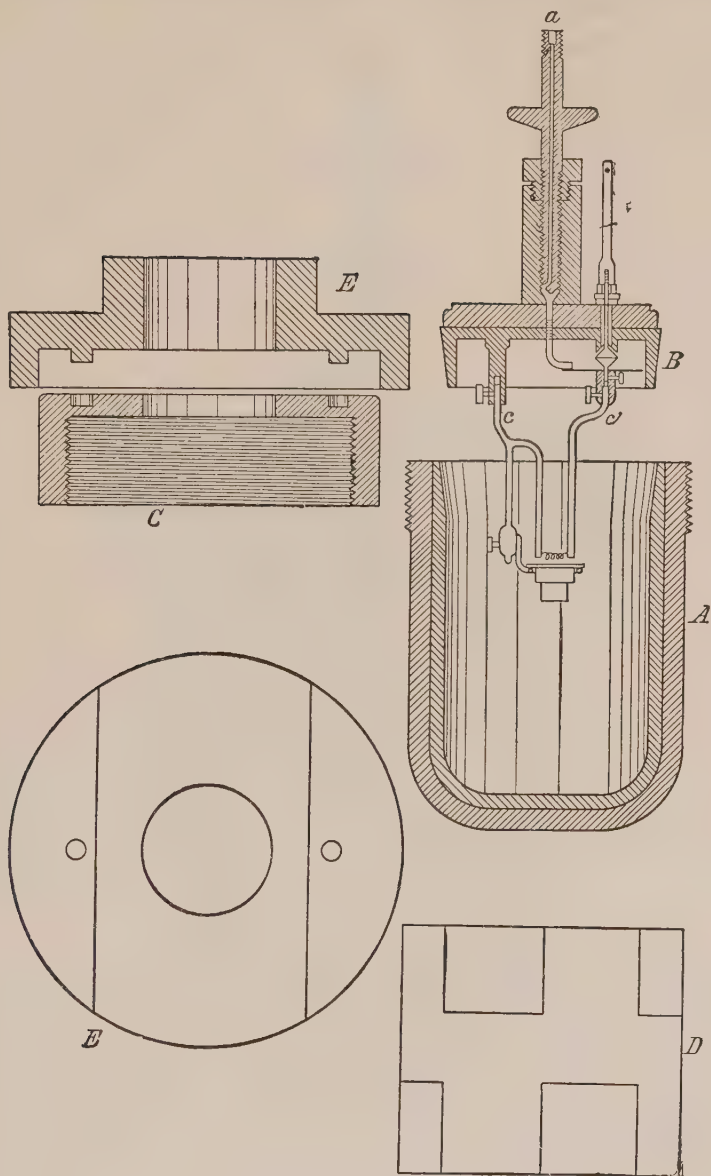


Fig. 26.

Die kalorimetrische Bombe nach Berthelot.

Sobald das Manometer 25 Atmosphären Druck anzeigt, wird die Bombe durch Zudrehen der Schraube *a* geschlossen. An der Innenseite des Deckels ist ein dicker Platindraht, der das Platinschälchen *b* zur Aufnahme der zu verbrennenden Substanz trägt, ferner sind hier die Poldrähte festgeschraubt. Der Poldraht *c* ist an denselben Draht, der das Platinschälchen trägt, gelötet und steht

auf solche Weise in leitender Verbindung mit der ganzen Bombe; der zweite Pol-
draht c^1 ist von dem übrigen Teile der Bombe durch Emaille oder Kautschuk
isoliert. Die Zündung erfolgt durch das Verbrennen eines um die Poldrähte
gewickelten Eisendrahtes, der die Substanz nur berührt.

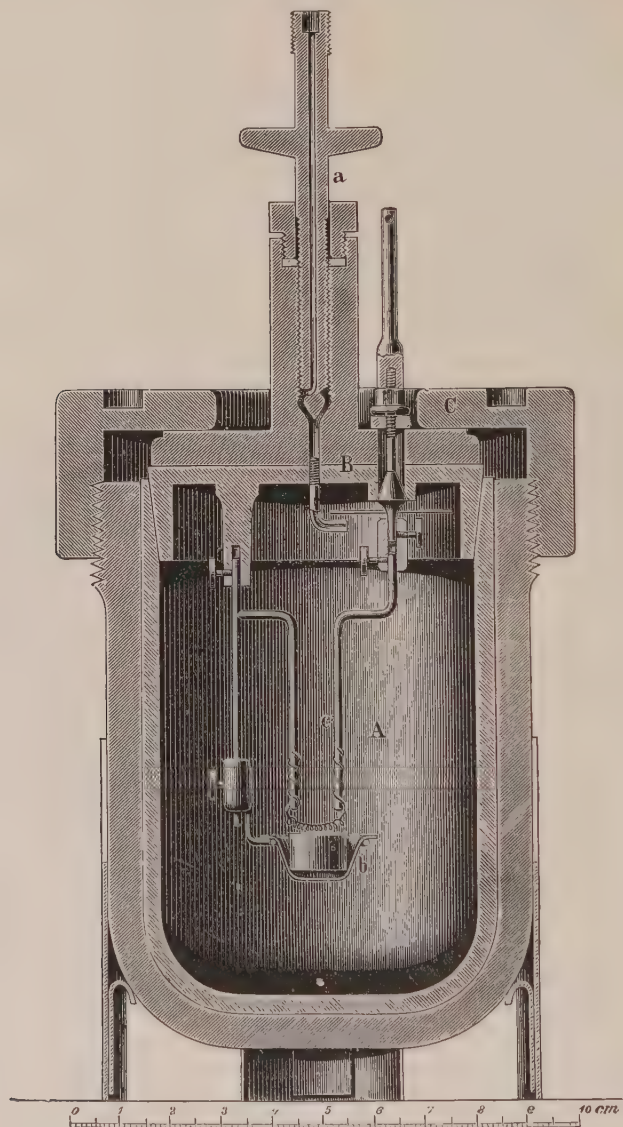


Fig. 27.
Die Berthelotsche Bombe geschlossen.

Da die Berthelotsche Bombe ca. 1300 g Platin enthält, so ist der Preis
verhältnismäßig hoch. Hempel und Mahler¹⁾ haben gleichzeitig die Ber-
thelotsche Konstruktion etwas modifiziert, indem sie das Platinfutter durch

¹⁾ W. Hempel, Die Elementaranalyse unter Druck in dem Autoklave.
Chem. Berichte 30, 202 (1897).

einen Überzug von Emaille ersetzen, die von den Säuren nicht angegriffen wird; die Dichtung der Bombe erfolgt durch einen Bleiring, der in den oberen Teil des Tiegels eingelassen ist. Zum Zwecke der Zündung bedient sich Hempel eines Zwirnfadens, den er in die Pastille einpreßt; bei Flüssigkeiten legt er den Faden in den Platinlöffel und bringt dann mittels einer kleinen Gewichtspipette einige Tropfen derselben. Zündet man mit Eisendraht, so kommt es bei sehr flüchtigen Substanzen vor, daß durch die Hitze der weißglühenden Eisenoxyd-oxydulkörner ein Teil der Substanz verdampft, sich aber nicht entzündet, so daß unvollständige Verbrennung entsteht¹⁾. Dasselbe gilt vom Platindraht. Nach dieser Konstruktion ist auch die Kröckersche Bombe ausgeführt. Der Deckel ist im Innern platiniiert, der Tiegel emailliert.

Die emaillierten Bomben haben aber den Nachteil, daß die Emaille mit der Zeit abspringt. So werden bei lebhaften Verbrennungen brennende Stücke der Substanz an die Wandungen geschleudert, sie schmelzen ein und reißen die Emaille ab. Um diesem Nachteil aus dem Wege zu gehen, konstruierte Langbein²⁾ eine Bombe mit Platinblecheinlage. Sie besteht, wie die Berthelotsche Bombe, aus Tiegel, Deckel, Überwurfschraube und Fuß. Die Dichtung des Deckels wird durch einen Bleiring erreicht, der in den Rand des Tiegels eingelassen ist. Die Zündung geschieht durch eine Zündschnur, da bei Anwendung von Eisendraht die abspringenden glühenden Eisenkugeln das Platinblech bald durchlöchern würden. Die Zündschnur wird an einem Platindraht von 0,1 mm Stärke aufgehängt, der zwischen beide Poldrähte gespannt ist. Der elektrische Strom bringt den Draht zum Glühen, die Zündschnur brennt an, schmilzt den Draht durch und fällt auf die Substanz.

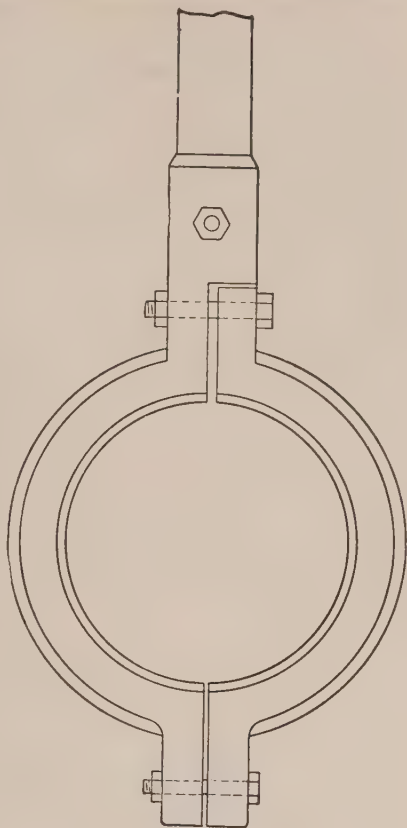


Fig. 28.
Stahlring.

6. Vorbereitung der Substanz.

Die zu verbrennende Substanz muß auf ihre Reinheit sorgfältigst geprüft werden, denn minimale Verunreinigungen können bedeutende Abweichungen in der Verbrennungswärme verursachen. Es empfiehlt sich daher, eine Doppel-elementaranalyse auszuführen, wobei die erhaltenen Mengen C und H von der theoretisch berechneten nicht mehr als um 0,15 Proz. differieren dürfen; Kohlenstoff kann etwas weniger, Wasserstoff etwas mehr als die theoretische Menge betragen.

Mittels der kalorimetrischen Bombe kann die Bestimmung des Brennwertes der Körper von verschiedenem Aggregatzustande ausgeführt werden.

a) Feste Körper.

Feste, leicht pulverisierbare Körper werden zu möglichst festen, zusammenhängenden Pastillen resp. Brikett geformt, da Teile der Substanz bei der Ver-

¹⁾ Bestimmung der nutzbaren Verbrennungswärme der Brennstoffe. Zeitschr. für Zuckerind. 46, 482 (1896).

²⁾ Langbein, Chemische und kalorimetrische Untersuchungen von Brennstoffen. Z. ang. 1900, 1227.

brennung fortgeschleudert werden und dadurch der Verbrennung entgehen können. Zu diesem Zwecke dient ein starkwandiger Stahlzylinder von 13 mm weiter Bohrung mit beweglichem Bodenteil und einem im Innenraum gleitenden Stempel. Man schüttet die Substanz in den Innenraum, setzt den Stempel auf und übt mit der Hand einen mehr oder weniger kräftigen Druck aus; genügt dies nicht, so nimmt man irgendeine Presse zur Hilfe. Nach Entfernung des Bodenteiles der Form läßt sich die fertige Pastille leicht mit dem Stempel aus der unteren Öffnung herausdrücken. Bequemer für diese Zwecke ist die Pastillenpresse. Die Pastille wird im Exsikkator aufbewahrt und unmittelbar vor der Verbrennung gewogen.

Die zur Verbrennung erforderliche Menge Substanz wird nach Luginin derart berechnet, daß zu ihrer Verbrennung nicht mehr als 20 Proz. der in der Bombe enthaltenen Sauerstoffmenge verbraucht wird. Faßt die Bombe z. B. 340 ccm, so beträgt ihre Sauerstoffmenge bei 24 Atmosphären Druck $300 \times 24 = 7,2$ Liter, die 10,296 g wiegen (1 Liter reinen Sauerstoffs wiegt bei gewöhnlichem

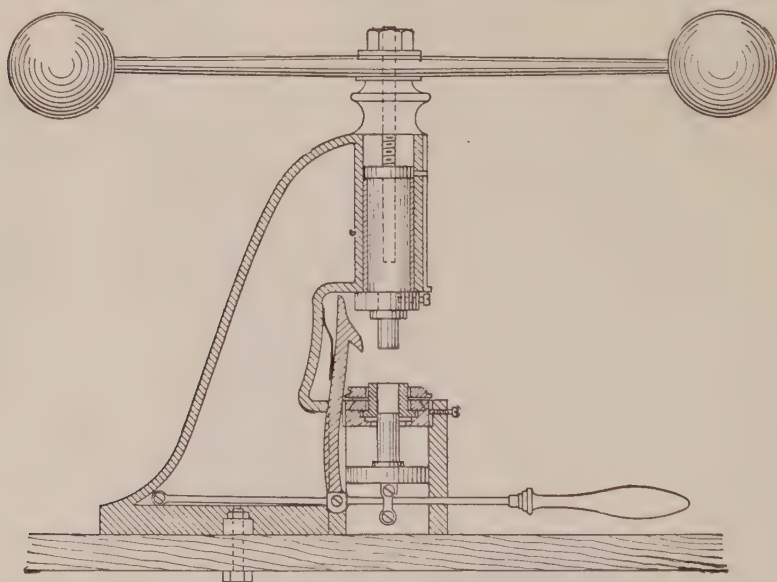


Fig. 29.
Pastillenpresse.

Druck etwa 1,43 g). Liegt beispielsweise Kampfer $C_{10}H_{16}O$ zur Untersuchung vor, das bei vollständiger Verbrennung $10 CO_2 + 8 H_2O$ liefert unter Verbrauch von 28 O, so berechnet sich die zu verwendende Menge Substanz nach folgender Proportion, wobei in Rechnung 27 gesetzt wird, da die Substanz selbst ein Atom Sauerstoff enthält:

$$\begin{aligned} C_{10}H_{16}O : x &= 152 : x = 270 : 10,296 \\ x &= \frac{152 \times 10,296}{27 \times 16} = 3,623 \text{ g,} \end{aligned}$$

die Menge des zu verbrennenden Kampfers beträgt somit 0,725 g.

Bei biochemischen Untersuchungen kommen verschiedene Substanzen in Frage, wie Nahrungs- und Futtermittel, Exkrete, Organe, Pflanzenteile usw., die eine besondere Vorbehandlung erforderlich machen.

Fleisch, Organe usw. Mageres Fleisch wird in der Fleischmaschine zerkleinert, in einer flachen Porzellanschale ausgebreitet und im Vakuum bei $50-60^\circ$ getrocknet, dann fein pulverisiert und aus dem Pulver 0,5—1,0 g schwere Pastillen dargestellt. Bei fettreichem Fleisch empfiehlt es sich, die frische Substanz zuerst mit einem kalten Gemisch von Alkohol und Äther unter öfterem Umschütteln einige Stunden stehen zu lassen, um den größten Teil des Fettes

zu entfernen, dann die Flüssigkeit abzufiltrieren, zu verdunsten und nach dem Trocknen zu wägen. In dem so erhaltenen Fett wird in einem aliquoten Teil eine Verbrennung gemacht und der erhaltene Wert auf die ganze Fettmenge berechnet. Der kalt entfettete Rückstand wird getrocknet, gewogen und dann pulverisiert; aus dem Pulver werden Pastillen von etwa 1 g hergestellt, verbrannt und auf die ganze Menge des Pulvers berechnet. Addiert man zu dieser Zahl den Brennwert des Fettes, so erhält man die Verbrennungswärme des lufttrocknen Fleisches.

In derselben Weise verfährt man, wenn es sich um Organe oder ganze Tier- oder Pflanzenleiber handelt, mit dem Unterschiede, daß bei ganzen Tieren drei Verbrennungen ausgeführt werden müssen: 1. In dem kalten Alkohol-Ätherextrakt, 2. in dem kalt entfetteten Rückstand nach dem Trocknen und Pulverisieren und 3. in den Haaren usw., die durch das Sieb nicht durchgehen.

Fette. Die zu untersuchenden Fette werden am besten dem Tierkörper unmittelbar nach dem Schlachten entnommen und am selben Tage verarbeitet. Das Fettgewebe wird zerschritten, im Wasserbade bis zum Ausschmelzen des Fettes erwärmt, das Fett im Heißwassertrichter durch Papier filtriert und getrocknet. Da nicht immer eine Entzündung stattfindet, so wird oft ein genau gewogenes Kriställchen Naphtalin (3—6 mg) auf das im Platinschälchen erstarrte Fett gelegt. Der Brennwert des Naphtalins wird mit 9628 cal. pro Gramm in Abzug gebracht.

Samen und Körner und deren Präparate werden möglichst fein pulverisiert; aus dem Pulver werden 0,5—1 g schwere Pastillen hergestellt. Bei fettreichen Samen verfährt man genau wie mit fettreichem Fleisch, indem man die Substanz zuerst mit Alkoholäther grob entfettet.

Brot. Eine genau gewogene Menge des frischen Brotes wird bei 100° getrocknet, an der Luft liegen gelassen, dann gewogen und fein pulverisiert. Zur Herstellung von Pastillen wird je 1 g Substanz angewandt.

Kot. Die Vorbereitung des Kotes zur Verbrennung geschieht in der Weise, daß man den von der ganzen Periode gesammelten Kot sorgfältig durchmischt, in ein möglichst weites tariertes Gefäß bringt, in dünner Schicht ausbreitet und im Vakuum bei 50° C eindampft.

Es ist bereits darauf hingewiesen worden, daß der frische Kot der meisten Tiere Ammoniak enthält, der beim Trocknen verloren geht und mit ihm ein Teil der Energie. Grouven¹⁾ fand im frischen Ochsenkot 0,0694 Proz. Ammoniak; Henneberg und Stohmann²⁾ bestimmten den Stickstoffgehalt in Kotproben, die mit oder ohne Zusatz von Salzsäure getrocknet waren und fanden im Stickstoffgehalt des ohne Salzsäure eingetrockneten Kotes einen Verlust von 0,18 Proz.; in bedeutend höherem Maße ist nach Zaitschek der Ammoniak im Kote anderer Säugetiere enthalten. Kellner³⁾ und neuerdings Zaitschek⁴⁾ halten es für wahrscheinlich, daß sich außer Ammoniumverbindungen noch andere stickstoffhaltige Körper, wie Harnstoff usw., beim Trocknen zersetzen. Um diesen Stickstoff- und Energieverlust zu verhüten, wird der frische Kot beim Trocknen mit einer Säure — Salzsäure, Schwefelsäure oder Weinsäure — bis zur sauren Reaktion versetzt oder man fängt die beim Trocknen entweichenden stickstoffhaltigen Substanzen in konzentrierter Schwefelsäure auf. Zaitschek hat in einer Reihe von Versuchen gezeigt, daß es nicht immer gelingt, den Stickstoffverlust beim Trocknen des Kotes vollständig zu verhüten und schlägt vor, den Stickstoffgehalt in mehreren Proben des frischen, sorgfältig durchgemischten Kotes zu bestimmen und mit dem Stickstoffgehalt des Trockenkotes zu vergleichen. Zu dem für den lufttrocknen Kot gefundenen Brennwert werden pro 1 g Stickstoffverlust 6,5 Kal. hinzuaddiert.

Fettreicher Kot läßt sich oft nach dem Trocknen schwer zerreiben, man kann dadurch keine homogene Mischung und folglich keine genauen Durch-

¹⁾ Grouven, Bericht der Versuchsstation zu Salzmünde 1864, 436.

²⁾ Henneberg und Stohmann, Beiträge zur Begründung einer rationalen Fütterung der Wiederkäuer. 2. Heft, 365 (1864).

³⁾ O. Kellner, Untersuchungen über den Stoff- und Energieumsatz volljähriger Ochsen bei Erhaltungsfutter. Landwirtschaftliche Versuchsstation 47, 275 (1896).

⁴⁾ Zaitschek, Zur Methodik des Stickstoff- und Eiweißgehaltes der Fäzes. Pflüg. Arch. 98, 595 (1903).

schnittswerte erhalten. Ferner wird bei der Herstellung der Pastillen leicht Fett ausgepreßt, und man wird so einem unkontrollierbaren bedeutenden Verlust ausgesetzt sein. In solchen Fällen ist es ratsam, den getrockneten Kot mit kaltem Äther zu übergießen und unter öfterem Umschütteln einige Stunden stehen zu lassen. Den Ätherextrakt filtriert man ab, trocknet nach dem Verdunsten des Äthers und wägt; in einem aliquoten Teil des so erhaltenen Fettes bestimmt man den Brennwert und berechnet auf die ganze Menge. Der auf diese Weise enttettete Kot wird vom anhaftenden Äther befreit, getrocknet und gewogen; hierauf werden Pastillen gemacht, in denen man den Brennwert bestimmt und auf die ganze Menge berechnet. Zu diesem Werte wird der Brennwert des Ätherextraktes resp. Fettes hinzuaddiert und man erhält den Gesamtbrennwert des ganzen Kotes.

b) Flüssige Körper.

Um Flüssigkeiten in der Bombe zu verbrennen, benutzt Berthelot ein zylindrisches Plattingeß, daß in denselben Ring gebracht wird, in dem das Schälchen sich gewöhnlich befindet. Leicht flüchtige Verbindungen, d. h. solche, die bei gewöhnlicher Temperatur eine merkliche Dampfspannung besitzen, werden vor Verdunstung dadurch geschützt, daß das Platinschälchen durch einen besonderen konischen Deckel aus Kollodium geschlossen wird. Diesen Deckel stellt Berthelot in folgender Weise her. Man verfertigt zuerst durch Aufblasen von Kollodium ein kleines Säckchen, schneidet den Boden dieses Säckchens ab und verbindet den oberen Teil mit dem Platinschälchen, indem man den Rand des Säckchens außen um das Platinschälchen herumlegt und mittels eines Pinsels mit Kollodium befestigt. Das Ganze wird bei mäßiger Wärme getrocknet. Hierauf zieht man die Öffnung des Säckchens mit einem Kollodiumfaden oder mit einem Platindraht zusammen und wägt. Dann bringt man die flüchtige Flüssigkeit mittels eines ausgezogenen Glasrohres in das Platinschälchen, wobei man darauf achtet, daß sie nirgends mit dem Kollodium in Berührung kommt. Nun verschließt man mit dem Faden und wägt wieder. Die Menge sowie der Brennwert des angewandten Kollodiums muß bekannt sein. Petit bedient sich kleiner Hohlkugeln aus Kollodium. Sie werden von vielen Flüssigkeiten nicht angegriffen, verhindern die Verdampfung und sind als Hilfsmittel zur vollkommenen Entzündung von Wert. Luginin (l. c.) bringt die zu verbrennende Flüssigkeit in einen kleinen zylindrischen Platintiegel, den er mit einem Docht von Asbest versieht; es findet dann eine stetige, nicht plötzliche Verbrennung statt, die einige Minuten dauert. Um leicht flüchtige Flüssigkeiten, wie Benzol- Methylalkohol usw., genau abwägen zu können und um jeden Verlust von Dampf während der Verdichtung des Sauerstoffs auszuschließen, schmelzen Stohmann, Kleber und Langbein die Flüssigkeit in einem sehr dünnwandigen Glaskügelchen ein, das nach dem Einfüllen des Sauerstoffs durch eine kurze Erschütterung der geschlossenen Bombe zertrümmert wird, was am eigentümlichen klirrenden Geräusch erkennbar ist.

Bei Verbrennung chlorhaltiger Körper verwendeten Berthelot und Matignon arsenige Säure und Wasser, wodurch alles Chlor in Salzsäure verwandelt wird, die in das Wasser übergeht. Nach der Verbrennung wird in einer Hälfte der in der Bombe enthaltenen Flüssigkeit die Menge der gebliebenen arsenigen Säure durch Titration mit Kaliumpermanganat und in der anderen Hälfte die gebildete Salpetersäure bestimmt und in Rechnung gesetzt. Von der Abwesenheit freien Chlors überzeugt man sich dadurch, daß man nach der Verbrennung die Gase durch eine schwach mit Indigo gefärbte Lösung gehen läßt. In manchen Fällen, wie z. B. bei Verbindungen von hohem Sauerstoffgehalt (wie Ameisensäure, Oxalsäure), von hohem Chlorgehalt (wie Chloroform, Chlorkohlenstoff) usw. entzündet sich die Substanz schwer oder gar nicht. Es empfiehlt sich dann, die Verbrennung unter Zuhilfenahme von Naphtalin oder Kampfer in Form von Pastillen von einigen Milligramm auszuführen, wobei man die Substanz zwischen zwei Pastillen legt; es findet eine momentane Entzündung statt.

Milch. Die zu untersuchende Milch wird vor der Probeentnahme mehrmals sorgfältig durchgeschüttelt, um eine homogene Flüssigkeit zu erhalten, da ja bekanntlich das Fett resp. die Sahne sich an der Oberfläche der Milch ansammelt (daß man ungenaue Resultate erhalten kann, braucht keiner besonderen Erwähnung). Von der gut durchgeschüttelten Milch nimmt man 5 cem, die man

in das Platinschälchen der Kalorimeterbombe portionsweise mittels eines Tropfgläschens bringt und im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure bei 60° C eindampft. Bei dem portionsweisen Eindampfen vermeidet man die Bildung einer unten hohlen Kruste, die das Eintrocknen der Milch bedeutend verlangsamt. Nach dem Verbrennen bleibt oft eine geringe Menge Kohle zurück, die man nachträglich bestimmen kann.

Bedeutend bequemer und rascher geht das Eindampfen der Milch bei Anwendung von Zelluloseblöckchen vonstatten. Man bringt das gewogene Blöckchen in das Platinschälchen der Kalorimeterbombe, tropft aus dem Gläschen soviel Milch auf, als das Blöckchen aufnehmen kann, trocknet bei 60° im Vakuum und wiederholt die Operation des Auftropfens und Trocknens solange, bis 5 cem Milch eingedampft sind. Das Blöckchen mit der Milch verbrennt vollständig. Von dem so erhaltenen Wert wird der Brennwert des Zelluloseblöckchens abgezogen.

c) Alkoholhaltige Flüssigkeiten.

Alkoholhaltige Flüssigkeiten, wie Bier, Wein usw. werden von dem in ihnen enthaltenen Alkohol durch Destillation einer genau gemessenen resp. gewogenen Menge Flüssigkeit befreit. In einem aliquoten Teil des so erhaltenen Alkohols wird der Brennwert bestimmt und dieser Wert auf die ganze Menge berechnet. Der von der Destillation gebliebene Rückstand wird genau gemessen resp. gewogen, ein aliquoter Teil davon unter Benutzung eines Zelluloseblöckchens im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure bei gewöhnlicher Temperatur zur Trockne eingedampft, in der Bombe verbrannt und der erhaltene Brennwert auf die ganze Menge Rückstand berechnet. Zu diesem Wert wird die Verbrennungswärme des Alkohols hinzuaddiert und man erhält so den Gesamtbrennwert der betreffenden alkoholhaltigen Flüssigkeit.

d) Blut.

Blut muß sofort nach der Entnahme verarbeitet werden, um eine Zersetzung zu vermeiden. Man trocknet eine genau gemessene resp. gewogene Menge Blut im Platinschälchen der Kalorimeterbombe im Vakuumexsikkator bei gewöhnlicher Temperatur bis zur Trockne ein. Stehen größere Mengen Blut zur Verfügung, empfiehlt es sich, das bis zur Gewichtskonstanz eingetrocknete Blut, nachdem es 12 Stunden an der Luft gestanden hat und gewogen wurde, fein zu pulverisieren und aus dem Pulver Pastillen herzustellen, die leichter und vollständig verbrennen.

e) Öle.

Die trocknenden Öle, Leinöl, Mohnöl werden im Wasserstoffstrome, die anderen Öle im Luftstrome bei 110—120° C getrocknet und auf ein Zelluloseblöckchen, das sich im Platinschälchen der Kalorimeterbombe befindet, aufgetropft. Da die Fette und Öle einen hohen Brennwert haben, ist es ratsam, nicht mehr als 0,5 g anzuwenden.

f) Harn.

Der beim Stoffwechselversuch gesammelte filtrierte Harn wird mit Chloroform, Toluol oder mit einem mittelgroßen Thymolkristall oder mit Thymolpulver versetzt, um eine Zersetzung zu verhüten. Da der Harn eine wässrige und darum nicht brennbare Flüssigkeit darstellt, so wird er zum Zwecke der Verbrennung im Vakuum zur Trockne eingedampft. Das Eintrocknen des Harnes erfolgt auf verschiedene Weise.

Rubner¹⁾ destilliert den Harn im Vakuumapparat bei 50° unter Vorlage von titrierter Schwefelsäure ab, um die Menge des sich zersetzenden Harnstoffs zu bestimmen. Zum Schluß wird die Temperatur auf etwa 70° erhöht, damit die ganze Masse fest wird und nicht hygroscopisch bleibt. Sehr gute Resultate

¹⁾ Rubner, Der Energiewert der Kost des Menschen. Zeitschr. für Biol. 42, 261 (1900).

erzielt Rubner durch das Trocknen des Harnes auf flachen Gefäßen unter Zusatz von etwas Oxalsäure auf einem gewöhnlichen Wasserbade, wobei er keinen Stickstoffverlust beobachtet hat. Die Korrektur für Oxalsäure ist sehr gering.

Um den Stickstoffverlust während des Eindampfens zu verhüten, fügte Tangl ¹⁾ einige Tropfen verdünnter Salzsäure hinzu. Die Versuche von Farkas und Korbuly haben ergeben, daß ein Zusatz von Säure Veränderungen im Harn hervorruft, die mit einer Verschiebung des Verhältnisses zwischen Energie- und Stickstoffverlust im voraus nicht berechenbarerweise verbunden ist, so daß eine aus dem N-Verlust berechnete Korrektur für den Brennwert sehr unsicher wird. Ein Zusatz von Salzsäure ist noch dadurch nachteilig, daß der Gehalt der Chloride größer wird, die die vollständige Verbrennung des Harnes sehr erschweren.

Da mancher Harn, z. B. Ochsenharn, infolge seines hohen Salzgehaltes nicht vollständig verbrennt und Kohle zurückläßt, versuchte Kellner ²⁾ Blöcke aus Filtrierpapier mit dem Harn zu imprägnieren und machte die Beobachtung, daß die imprägnierten, getrockneten Blöcke glatt, ohne jede Spur von Kohle und Ruß verbrannten. Er verfährt so, daß der zu verbrennende Harn in reine, trockene Tropfgläschen gefüllt wird, die mit Kork oder Gummikappe verschlossen und gewogen werden. Aus diesen wird dann auf die gewogene Zelluloseblöckchen, die sich in kleinen Glasschälchen befinden, soviel Harn aufgetropft, daß die Unterlage nicht benetzt wird. Die Blöcke werden dann bei 60° getrocknet und die Operation des Auftropfens und Trocknens solange wiederholt, bis 10—15 g Harn eingedampft sind. Bei der Berechnung der Verbrennungswärme des Harnes wird der Brennwert des Zelluloseblöckchens in Abzug gebracht. — Trotzdem der Brennwert des Zelluloseblöckchens den größten Teil der Gesamtbrennwärme ausmacht, weichen die Einzelbestimmungen höchstens um 0,5 Proz. voneinander ab. Auch der Fehler, der beim Eindampfen des Harnes durch den Stickstoffverlust bedingt wird, ist nicht groß, er beträgt nicht mehr als 1 Proz. des Gesamtbrennwertes.

Rubner hält dieses Verfahren von Kellner bei der Verbrennung von verdünnten Harnen, wie Menschenharn, Hundeharn usw., für unbrauchbar, teils infolge der allzuhohen Verbrennungswärme des Zelluloseblöckchens, die $\frac{1}{2}$ — $\frac{2}{3}$ der Gesamtbrennwärme ausmacht, so daß alle Fehler auf den kleineren Wärmeanteil aus Harn fallen, teils dadurch, daß manchmal ein 20—30maliges Aufsaugen und Wiederverdunsten nicht ausreicht, um eine genügende Menge trockenen Harns zu erhalten, wobei eine umfangreiche Zersetzung des Harns unvermeidlich ist. Diese Beobachtung machten auch Farkas und Korbuly ³⁾ bei der Verbrennung von Menschen- und Tierharnen mit und ohne Zelluloseblöckchen, wobei sie bei der Verbrennung ohne Zellulose höhere Werte erhalten. Im übrigen halten sie Rubners Einwand für nicht gerechtfertigt. Sie halten die Anwendung der Zelluloseblöckchen nur in den Fällen für angebracht, wenn eine vollständige Verbrennung des Harnes infolge eines zu hohen Aschengehaltes sonst nicht gelingt.

A. Loewy ⁴⁾ trocknet den mit Thymol versetzten Harn im Vakuum über Schwefelsäure, wobei er den Stickstoffverlust aus dem N-Gehalte der Schwefelsäure, als auch der einzelnen Zelluloseblöckchen bestimmt, die genau wie die zur Verbrennung angewandten mit Harn behandelt waren. Aus Cronheims ⁵⁾ Versuchen, die er mit verschiedenen Konservierungsmitteln ausgeführt hat, wie Fluornatrium in wässriger Lösung, Thymol in 10prozentiger alkoholischer Lösung und Chloroform — geht hervor, daß bei Anwendung von Fluornatrium und Thymol keine oder wenigstens den Brennwert nicht wesentlich beeinflussende Veränderungen stattfinden. Die Differenzen gegen die Werte des frischen Harnes bewegen sich in den Grenzen der Versuchsfehler; dagegen sind die Brenn-

¹⁾ Tangl, Beitrag zur Kenntnis des Energiegehaltes des menschlichen Harnes. Arch. für (Anat.) und Phys. 1899, 254.

²⁾ Kellner, Untersuchungen über den Stoff- und Energieumsatz volljähriger Ochsen. Landwirtschaftliche Versuchstation 47, 275 (1896).

³⁾ Farkas und Korbuly, Kritisch-experimentelle Studien über die Kalorimetrie des Harnes. Pflügers Archiv 104, 564.

⁴⁾ A. Loewy, Beiträge zum Stoff- und Energieumsatz des Menschen. Arch. (Anat.) Phys. 1901, 299.

⁵⁾ Cronheim, Konservierung des Harnes für analytische und kalorimetrische Zwecke. Arch. (Anat.) Phys., Suppl. 1902, 262.

werte des mit Chloroform versetzten Harnes auffallend hoch, wie nachstehende Zusammensetzung zeigt:

Die Menge des zur Verbrennung angewandten Harnes betrug 5 ccm.

Harn frisch	mit Thymol	mit NaFl	mit CHCl_3
680,8 { i. M.	681,8 { i. M.	674,1 { i. M.	691,6 { i. M.
652,5 { 668,5 cal.	681,9 { 674,4 cal.	690,1 { 678,8 cal.	723,8 { 698,7 cal.
672,3 {	659,4 {	672,1 {	681,8 {

Farkas und Korbuly halten es für zweckmäßig, den Harn direkt in dem Platinschälchen der Kalorimeterbombe einzudampfen und nur in solcher Menge, daß beim Verbrennen 1—1,5 Kal. resultieren. Das Eintrocknen geschieht im Vakuum, bei Zimmertemperatur, ohne Zelluloseblöckchen und ohne irgend- einen anderen Zusatz.

Beim Eintrocknen des Harnes findet eine Zersetzung und ein damit verbundener Verlust an chemischer Energie statt. Als Maß für diese Zersetzung wird der beim Eindampfen entweichende Stickstoff betrachtet; in Form welcher Verbindungen der Stickstoff entwichen ist, wird auf verschiedene Weise erklärt und die Korrektur der Verbrennungswärme ebenfalls in verschiedener Weise berechnet.

Rubner¹⁾ nimmt als Quelle des Energieverlustes die Zersetzung des Harnstoffs an, als Korrektur der Verbrennungswärme des Harns (1 g Harnstoff liefert 2523 cal.) rechnet er für 1 g verlorenen Stickstoffs 5407 g-cal., die der gefundenen Wärmemenge hinzuaddiert werden müssen. Er dampfte Hundeharn mit der entsprechenden Menge Bimssteinpulver auf dem Wasserbade vollständig ein. Zugleich wurde eine Trockenbestimmung des Harns in der Weise ausgeführt, daß 10—15 ccm Harn in eine mit Bimsstein zum Teil gefüllte, mäßig erwärmte Liebig'sche Ente gebracht wurde, durch die ein wasserfreier Luftstrom strich, der durch einen mit titrierter Schwefelsäure gefüllten Kolben geleitet wurde. Mit den Wasserdämpfen entweichen auch die aus der Zersetzung entstehende Kohlensäure und Ammoniak; letzteres wird durch Titrieren bestimmt. Die Verbrennung des Harnes wurde nach der Kaliumchloratmethode ausgeführt und der Brennwert aus zwei Komponenten berechnet:

1. Aus dem Wärmewert der auf Bimsstein eingetrockneten Masse.

2. Aus der Verbrennungswärme des Harnstoffes, der durch die Zersetzung der auf Bimsstein getrockneten Masse zu Verlust ging.

Die zersetzte Harnstoffmenge berechnete er aus der Gewichts-differenz der Trockensubstanzen des mit Bimsstein auf dem Wasserbade und des in der Liebig'schen Ente getrockneten Harnes. Die in Punkt 2 angegebene Korrektur beruht auf der Annahme, daß außer Harnstoff keine andere stickstoffhaltige Substanz zersetzt wird.

Krummacher²⁾ spricht die Vermutung aus, daß der Stickstoff ausschließlich aus Ammoniaksalzen stamme, da sich bei der Destillation in der Vorlage weniger Stickstoff findet als in den Ammoniaksalzen des zur Destillation benutzten Harnes. Da die Verflüchtigung des Ammoniaks einer Zersetzung von Harnstoff und anderen organischen Stickstoffverbindungen vorausgehen dürfte, hält es Krummacher für wahrscheinlich, daß bei der Destillation nur präformiertes Ammoniak entwichen ist. Er fand ferner, daß die Azidität des destillierten Harns geringer ist als die des Rückstandes; es mußte daher ein flüchtiges Alkali entwichen sein. Die dabei stattfindenden Wärmetönungen können infolge ihres geringen Betrages vernachlässigt werden, und man setzt nur den Brennwert des verlorenen Ammoniaks in Rechnung, der pro 1 g N 6,5 Cal. beträgt. Frentzel geht von der Überlegung aus, „daß sich die in Verlust gegangenen Kalorien proportional dem Stickstoffverlust verhalten“ und berechnet die Korrektur aus dem verlorengegangenen Stickstoff mittels des kalorischen Quotienten des Harnes Cal. Diese Korrektur gibt viel zu hohe, von anderen bedeutend abweichende Werte.

¹⁾ Rubner, Kalorimetrische Untersuchungen. Zeitschr. für Biol. 21, 281 (1885).

²⁾ Krummacher, Beiträge zur Frage nach dem Nährwert des Leims. Zeitschr. für Biol. 42, 242.

g) Gasförmige Körper.

Die Verbrennung von Gasen in der kalorimetrischen Bombe geschieht unter ganz anderen Bedingungen als bei festen und flüssigen Körpern. Das zu prüfende Gas bildet mit dem Sauerstoff von Anfang an eine homogene Mischung. Um eine möglichst hohe Temperatur und eine vollständige Verbrennung der Gase zu Kohlensäure und Wasser zu erzielen, darf der Sauerstoff keinesfalls im Überschuß, sondern in der zur vollständigen Verbrennung erforderlichen Menge vorhanden sein — nur bei Einhaltung dieser Bedingung findet vollständige Verbrennung statt. Für Gase unter gewöhnlichem Druck ist ein Druck des Sauerstoffs von 25 Atmosphären ein viel zu hoher, im Gegensatz zu den festen und flüssigen Körpern. Man muß den Sauerstoff unter verschiedenem Druck anwenden, je nach der Zusammensetzung des zu untersuchenden Gases; ist diese bekannt, so läßt sich der nötige Druck des Sauerstoffs berechnen. Zu diesem Zweck bestimmt man den Inhalt der Bombe, indem man sie mit Wasser von bestimmter Temperatur füllt, in einen evakuierten Raum bringt, um die im Wasser enthaltene Luft zu entfernen und dann mit luftfreiem Wasser vollständig füllt. Hierauf schließt man die Bombe, trocknet das ausgetretene Wasser mit Fließpapier ab und wägt. Diese Manipulation wiederholt man mehreremal und nimmt den mittleren Wert von allen bei derselben Temperatur gemachten Wägungen. Da das Gewicht der leeren Bombe und die Dichtigkeit des Wassers bei der betreffenden Temperatur bekannt ist, so läßt sich der Inhalt der Bombe leicht berechnen, wobei der Gewichtsverlust des Wassers in der Luft berücksichtigt werden muß. Das Gasvolumen ist bei jedem Versuch genau bekannt und wird durch Bestimmung des Gewichtes der sich bei der Verbrennung bildenden Kohlensäure kontrolliert.

Berthelot führt die Verbrennung nach zwei verschiedenen Methoden aus. Da die erste Methode keine absolut genauen Werte liefert, sei hier nur die zweite erwähnt.

Man mischt das zu prüfende Gas mit reinem Sauerstoff in geringem Überschuß, bereitet von diesem Gemisch etwa 2 Liter, bringt es in ein Glasgefäß über Quecksilber und sättigt es mit Wasserstoff. Hierauf verbindet man das obere Ende der Bombenschraube mit der Quecksilberpumpe, macht die Bombe luftleer, verbindet sie durch Kapillarröhren unter Anwendung eines Dreiwegehahnes mit dem Glasgefäß und füllt sie mit Gas. Jetzt unterbricht man die Verbindung der Bombe mit dem Glasgefäß, pumpt sie nochmals aus und entfernt auf solche Weise die letzten Luftspuren, die in ihr nach dem letzten Auspumpen zurückgeblieben sind, und füllt die Bombe nochmals mit Gas, wobei man das Glasgefäß leicht in das Quecksilber der Wanne hineindrückt, so daß das in die Bombe tretende Gas unter einem den Atmosphärendruck etwas übersteigenden Druck steht. Nun bringt man die mit Gas gefüllte Bombe in ein Glasgefäß mit Wasser von genau bestimmter Temperatur und läßt sie darin stehen, bis sie die Temperatur des Wassers angenommen hat. Dann öffnet man einen Augenblick das Schraubenventil, damit sich das eingeschlossene Gas mit dem Atmosphärendruck ausgleicht, schließt darauf das Ventil und berechnet die Menge des angewandten Gases. Daraus berechnet sich der Druck, der zur vollständigen Verbrennung des angewandten Gases erforderlich ist.

Es sei das in der Bombe enthaltene Gas z. B. Äthylen, das zur vollständigen Verbrennung das dreifache seines Volumens Sauerstoff erfordert: der Gesamtdruck des Gemisches muß sich auf 4 Atmosphären stellen. Mit Rücksicht aber auf den Stickstoffgehalt nimmt man einen gewissen Überschuß, etwa 10 Proz. mehr Sauerstoff, so daß der Druck des Gasgemenges etwa $4\frac{1}{2}$ Atmosphären gleich sein muß.

Nun verbindet man die Bombe mittels eines Kapillarschlauchs mit dem Sauerstoffbehälter, schaltet in diese Verbindung ein Quecksilbermanometer ein, das Drucke bis zu 10 Atmosphären angibt, wobei jede Atmosphäre in 10 Teile geteilt ist, und sobald der erforderliche Druck hergestellt ist, schließt man die Hähne und bringt die Bombe in das Kalorimeter.

Um sich zu überzeugen, ob eine vollständige Verbrennung des Gases stattgefunden hat, bestimmt man die in der Bombe durch die Verbrennung gebildete Kohlensäure, indem man die Bombe mittels eines Dreiwegehahnes einerseits mit einer Quecksilberpumpe, andererseits mit dem gewöhnlichen System von Absorptionsröhren für die Elementaranalyse verbindet, wobei das berücksichtigt werden muß, daß das Gewicht der gebildeten Kohlensäure etwa 3—4 g beträgt.

Nun öffnet man vorsichtig das Schraubenventil der Bombe und läßt die Gase durch die Absorptionsröhren langsam gehen, so daß man die Blasen zählen kann, wie bei der Elementaranalyse. Wird der Druck in der Bombe gleich dem Atmosphärischen, so tritt kein Gas mehr aus und man muß das in der Bombe zurückgebliebene Gas auspumpen. Man schließt das Schraubenventil, unterbricht durch Verstellen des Dreiwegehahnes die Verbindung mit den Absorptionsröhren und stellt zugleich eine Verbindung mit der Pumpe her. Nun öffnet man das Schraubenventil und saugt die Gase in den Rezipienten der Pumpe. Die im Rezipienten gesammelten Gase werden nach und nach aus demselben herausgedrückt und durch die oben erwähnten Absorptionsröhren langsam durchgelassen; diese Operation wiederholt man drei- bis viermal. Zur Entfernung der letzten Spuren von Gasen, die in der Bombe noch geblieben sind, wird letztere mit kohlensäurefreier Luft ausgespült und man wiederholt mit dem neuen auf diese Weise erhaltenen Gasgemisch dieselben Operationen vier- bis fünfmal, bis in der Bombe keine wägbare Menge Kohlensäure zurückbleibt. Hierauf werden die Verbindungen gelöst, die Absorptionsapparate gewogen, dann mit der Bombe wieder verbunden und, nachdem die Bombe etwa zweimal ausgespült worden war, wieder gewogen; ändert sich das Gewicht nicht, so ist der Versuch zu Ende.

7. Vorbereitung der Bombe.

Man legt den Deckel der Bombe mit abwärts gerichteten Poldrähten mit seinem Rande auf den Ring eines Stativs. Der zur Zündung dienende Eisendraht (etwa 5—6 cm) wird, falls er nicht mit in die Substanz gepreßt wird, durch Aufwickeln auf eine dicke Stecknadel zu einer Spirale geformt, deren Enden entweder unmittelbar um die beiden Poldrähte geschlungen oder mittels feiner Platindrähte an denselben befestigt werden. Nun wird das sorgfältig gereinigte und geglühte Schälchen mit der gewogenen Substanz in den zu seiner Aufnahme bestimmten Ring gehängt und letzterer soweit gehoben, bis die Substanz gerade die Eisenspirale berührt. Darauf bringt man in den Tiegel der Bombe eine geringe Menge Wasser zur Aufnahme der sich bildenden Salpetersäure hinein, verschließt die Bombe und füllt sie in der angegebenen Weise mit komprimiertem Sauerstoff, bis das Manometer 52 Atmosphären zeigt.

Die Füllung mit Sauerstoff geschieht am bequemsten mit

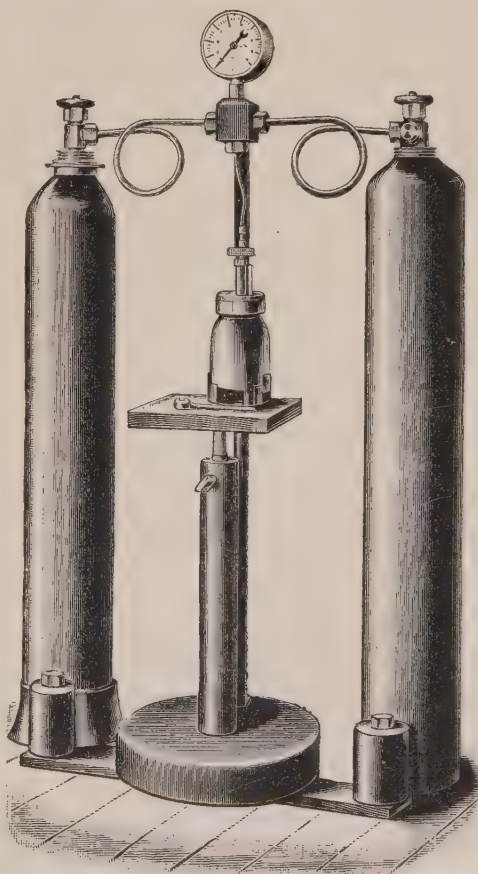


Fig. 30. Sauerstoffüberführapparat.

dem in Stahlzylindern käuflichen komprimierten Sauerstoff (Fig. 30). Um den Inhalt der Sauerstoffbehälter bei der Überführung des Gases in die Bombe ausnützen zu können, sind zwei derselben durch ein gemeinschaftliches Zwischenstück, das zugleich das Manometer trägt, so untereinander gekuppelt, daß sowohl die eine, wie die andere, einfach durch Umstellung der Ventile, mit der Bombe in Verbindung gebracht werden kann. Ist z. B. in Flasche *A* nur noch ein Druck von 10 Atmosphären vorhanden, so läßt man aus dieser das Gas in die Bombe übertreten und ergänzt dann, nach Abschluß von *A*, den Druck aus der Flasche *B*, deren Inhalt noch unter hoher Spannung steht.

Stohmann leitet den Sauerstoff, bevor er in die Bombe tritt, durch ein glühendes Kupferrohr, um die etwa vorhandenen verbrennlichen Stoffe zu zerstören.

8. Ausführung der Verbrennung.

Die so vorbereitete Bombe wird in das mit einer genau gewogenen Menge Wasser gefüllte Gefäß des Kalorimeters gebracht, wobei man die Bombe so weit im Wasser eintaucht, daß nur die Verschlußschraube hervorragt. Nachdem die Bombe mit den Polen der Batterie verbunden ist, setzt man das Thermometer ein, legt die Deckel auf und läßt das Rührwerk gehen, bis sich die Temperatur der Bombe mit der des Wassers ausgeglichen hat, was nach etwa 5 Minuten eintritt. Nun wird der Stand des im Kalorimeter befindlichen Thermometers von Minute zu Minute abgelesen, solange, bis sich keine wesentlichen Verschiedenheiten zeigen, d. h. bis die Temperatur konstant bleibt oder gleichmäßig steigt oder gleichmäßig fällt. Man erhält auf diese Weise eine Reihe von Ablesungen des Vorversuches $t_1, t_2, t_3 \dots t_{n1}$. Dann schaltet man den Strom ein, wodurch die Substanz in der Bombe entzündet wird — erkennbar am rapiden Steigen der Temperatur, sowie am Erlöschen einer eingeschalteten kleinen elektrischen Lampe — und schaltet sofort wieder aus. Die letzte Ablesung des Vorversuches t_{n1} wird als Anfangstemperatur der Verbrennung resp. des Hauptversuches angenommen und mit D_0 bezeichnet. Mit der 60. Sekunde wird die zweite Ablesung D_2 gemacht und so von Minute zu Minute fortgefahren, bis eine Temperaturabnahme resp. Temperaturkonstanz wahrgenommen wird, was in etwa 4—5 Minuten eintritt. (Die erste Ablesung des Hauptversuches kann infolge des rapiden Steigens des Quecksilberfadens ohne Lupe geschehen.) Auf diese Weise erhält man eine Reihe von Ablesungen des Hauptversuches $D_1, D_2, D_3 \dots D_n$. Mit der letzten Ablesung D_n des Hauptversuches beginnt der Nachversuch, dessen erste Beobachtung $t'_n = D_n$. Man beobachtet das Fallen des Thermometers von Minute zu Minute, bis sich gleiche Unterschiede zeigen, was nach etwa 5 Minuten eintritt, und erhält so die Beobachtungsreihe $t'_1, t'_2, t'_3 \dots t'_{n2}$.

Hierauf nimmt man die Bombe aus dem Kalorimeter heraus, entfernt den überschüssigen Sauerstoff, sowie die Verbrennungsgase

durch Öffnen des Gasabzugskanals und öffnet dann die Bombe mittels eines Hebels. Die Bombe wird mit Wasser ausgespült, die Flüssigkeit in ein Becherglas gebracht und die darin enthaltene Salpetersäure durch Titration mit $\frac{1}{10}$ Normalkalilauge bestimmt.

9. Berechnung einer kalorimetischen Verbrennung.

Die Berechnung geschieht nach folgender Gleichung:

$$C = T \times W - (a + b),$$

worin C die Verbrennungswärme der Substanz, W Wasserwert des Kalorimeters, T die Temperaturerhöhung während des Hauptversuches, a den Brennwert des Eisendrahtes und b den kalorischen Wert der gebildeten Salpetersäure bedeuten.

Da das Kalorimeterwasser von außen her Wärme aufnehmen oder abgeben kann, so muß man gewisse Korrekturen anbringen, welche die wahre Temperaturdifferenz erst ergeben und die durch Wärmeaufnahme oder Wärmeabgabe bedingte Fehler eliminieren. Diese Korrektur wird nach der zuerst von Regnault und Pfaundler ¹⁾ aufgestellten

$$W + \frac{v' - v}{\tau' - \tau} \left[\frac{1}{\sum_{n=1}} \vartheta + \frac{\vartheta_0 + \vartheta_n}{2} - n\tau \right]$$

und von Stohmann ²⁾ durch einen empirischen Faktor ergänzten Formel berechnet:

$$\frac{v - v'}{\tau - \tau'} \left[\frac{1}{\sum_{n=1}} \vartheta + \frac{\vartheta_0 + \vartheta_n}{2} + \frac{\vartheta_1 - \vartheta_0}{9} - n\tau \right] - nv,$$

(Da die Temperatur des Kalorimeterwassers gewöhnlich unter der Temperatur der Umgebung liegt, v somit stets negativ ausfällt, so ist es zweckmäßig, $v =$ mittlerer Temperaturanstieg in der Vorperiode und $v_1 =$ mittlere Temperaturschwankung in der Nachperiode zu setzen, wodurch die Formel die obenstehende Form angenommen hat.)

in der

$v' =$ mittlere Temperaturschwankung während der Vorperiode

$$\text{pro Minute } v = \frac{\tau_{n_1} - \tau_1}{n_1 - 1}$$

$v =$ mittlere Temperaturschwankung während der Nachperiode

$$\text{pro Minute } v' = \frac{\tau'_{n_2} - \tau'_1}{n_2 - 1}$$

$$\tau = \text{mittlere Temperatur der Vorperiode } \tau = \frac{\tau_1 + \tau_2 + \tau^3 + \dots + \tau_{n_1}}{n_1}$$

$\tau' =$ mittlere Temperatur der Nachperiode

$$\tau' = \frac{\tau'_1 + \tau'_2 + \tau'_3 + \dots + \tau'_{n_2}}{n_2}$$

¹⁾ Regnault und Pfaundler, Über die Wärmekapazität verschiedener Bodenarten. Pogendorffs Annalen **129**, 114 (1866).

²⁾ Stohmann, Über die Methode der Verbrennung organischer Substanzen. J. pr. **39**, 503 (1889).

ϑ = Temperaturen der Hauptperiode sind.

Stohmann stellt die letzte Ablesung der Vorperiode, die ϑ_0 bezeichnet ist, noch einmal als erstes Glied in die Hauptperiode ein.

$$\text{Setzt man } \sum_1 \vartheta v = \vartheta_1 + \vartheta_2 + \vartheta_3 + \dots + \vartheta_n + \frac{\vartheta_1 - \vartheta_0}{9},$$

(Da wegen des nicht gleichförmigen Temperaturverlaufes die mittlere Temperatur der ersten Minute etwas höher liegt als das arithmetische Mittel der Temperaturen zu Anfang und zu Ende derselben, addierte Stohmann den in einigen Versuchen zu nahezu $\frac{1}{9}$ der Differenz $\vartheta_2 - \vartheta_1$ gefundenen empirischen Faktor zu der ursprünglichen Regnault-Pfaunderschen Formel.)

so berechnet sich auch die Korrektur nach folgender Formel:

$$\Sigma \Delta \tau = \frac{v - v'}{\tau - \tau'} \left[\sum_1^{n-1} \vartheta v + \frac{\vartheta_n + \vartheta_0}{2} - n\tau \right] nv$$

Die obige Formel gestaltet sich demnach folgendermaßen:

$$C = (T + \Sigma \Delta \tau) \times W - (a - b).$$

Die so berechnete Korrektur wird der Endtemperatur zugezählt bzw. abgezogen und mit dem Wasserwert des Apparates multipliziert, um die Wärmeentwicklung zu berechnen. Von dieser Zahl werden abgezogen: 1. der Brennwert des Eisendrahtes und 2. der Brennwert der gebildeten Salpetersäure. Außerdem ist bei Verbrennungen von schwefelhaltigen Stoffen eine Korrektur für die gebildete Schwefelsäure zu berücksichtigen und bei Verbrennungen von Substanzen, die hygroskopisches Wasser enthalten, eine solche für die Bildung von Wasserdampf. Ferner wird auch bei der Verbrennung von flüchtigen Flüssigkeiten für eine Korrektur Sorge getragen.

Korrektur für den Eisendraht usw. Der gewöhnliche feinste Eisendraht zeigt einen Brennwert von 1601 cal. pro 1 g; demnach hat man bei Anwendung eines solchen Drahtes, z. B. von 5,7 mg Gewicht und 5 cm Länge, 9,10 cal. in Abzug zu setzen.

Korrektur für Salpetersäure und Schwefelsäure. Bei der Verbrennung bildet sich in der Bombe Salpetersäure, die von dem dem eingefüllten Sauerstoff beigemengten Stickstoff herrührt. Die Salpetersäure löst sich in dem in der Bombe befindlichen Wasser. Nach Berthelot werden bei der Bildung von in Wasser gelöster Salpetersäure 14,3 cal. pro Gramm-Molekül (63) frei. $1 \text{ g HNO}_3 = \frac{14,3 \times 1000}{63} = 227 \text{ cal.}$ Die Menge der gebildeten Salpetersäure wird

nach jedem Versuch bestimmt und die durch ihre Bildung bedingte Verbrennungswärme in Abzug gesetzt.

Nachdem man die Bombe geöffnet hat, spült man sie mit Wasser aus und titriert die darin enthaltene Säure mit einer Lösung von Natriumkarbonat unter Zusatz von Methylorange. Enthält die Sodalösung genau 3,706 g Na_2CO_3 im Liter und ist also $\frac{63}{14,3} = 4,406 \text{ g HNO}_3$ äquivalent, so entspricht 1 cm der zum Neutralisieren der Salpetersäure erforderlichen Lösung auch 1 cal., und man zieht die Zahl der verbrauchten Kubikzentimeter der Lösung als kleine Kalorien ab.

Entsteht bei der Verbrennung Schwefelsäure, so werden beide Säuren nach dem Langbeinschen¹⁾ Verfahren bestimmt. Die aus der Bombe ausgespülte Flüssigkeit erhitzt man zwecks Vertreibung der Kohlensäure, die das in der Bombe befindliche Wasser unter dem Druck von 25 Atmosphären sättigt, titriert dann die heiße Flüssigkeit unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator mit $\frac{1}{10}$ Normalbarytwasser bis zur Neutralisation, wodurch schwefelsaurer und salpetersaurer Baryt entstehen. Hierauf setzt man einen Überschuß Sodalösung (20—30 ccm) hinzu, die 3,706 g Na_2CO_3 im Liter enthält, und läßt einige Zeit stehen; es verwandelt sich dabei der salpetersaure Baryt in kohlensaurer, der ausfällt, während der schwefelsaure Baryt unverändert bleibt. Nun wird filtriert und im Filtrat die überschüssige Soda mit $\frac{1}{10}$ Normalsalzsäure unter Zusatz von Methylorange als Indikator bestimmt.

Es wurden z. B. 0,2237 g Saccharin (Ortho-Sulfaminbenzoesäureanhydrid) verbrannt. Hat man angewandt:

zur Neutralisation. 26,7 ccm Barytlauge,
zur Zersetzung des Bariumnitrates 21,5 ccm Sodalösung,
zur Bestimmung der überschüssigen Soda . . 12,5 ccm Salzsäure,
und entsprechen 10 ccm Barytlauge oder Salzsäure 14,3 ccm Sodalösung, so waren also für gebildete Salpetersäure 3,6 ccm Soda verbraucht (12,5 ccm Salzsäure entsprechen 17,9 Soda; $21,5 - 17,9 = 3,6$). Die 3,6 ccm Sodalösung entsprechen 2,5 ccm Barytlauge, also gehen von den verbrauchten 26,7 ccm Barytlauge 2,5 ccm für Salpetersäure ab, und es bleiben 24,2 ccm für Schwefelsäure. 1 ccm $\frac{1}{10}$ Normalbarytlauge entspricht 0,0016 g Schwefel, $24,2 \text{ ccm} = 0,03872 \text{ g S} = 17,31 \text{ Proz.}$ (theoretisch berechnet 17,49 Proz.) S der angewandten Substanz.

Bei den schwefelhaltigen organischen Stoffen verbrennt der Schwefel gewöhnlich zu Schwefelsäureanhydrid, und dieses löst sich in Wasser zu verdünnter Schwefelsäure auf. Es erscheint daher am richtigsten, die Schwefelsäure auf die schweflige Säure zu reduzieren. Die Bildungswärme der Schwefelsäure beträgt:



Für 1 g H_2SO_4 berechnen sich daher

$$\frac{54,4 \times 1000}{98} = 555,1 \text{ cal.}$$

Die bei der Verdünnung der Schwefelsäure mit Wasser frei werdende Wärme berechnet sich nach folgender Formel:

$$W = \frac{17860 \cdot b}{98a + 32,37},$$

worin a die Menge der Schwefelsäure, b die Menge des Wassers bedeutet.

¹⁾ Langbein, Chemische und kalorimetrische Untersuchung von Brennstoffen. Zeitschr. für angew. Chem. 1900, 1227.

Wenn man stets 10 ccm Wasser in die Bombe bringt, kann man mit voller Genauigkeit für je 1 Proz. Schwefel 22,5 cal. in Abzug bringen, um die verdünnte Schwefelsäure auf gasförmige schweflige Säure zu reduzieren.

Korrektur für Wasserdampf. Das in der Substanz enthaltene hygroskopische Wasser geht bei der Verbrennung in den dampfförmigen Zustand über, ebenfalls entsteht aus dem Wasserstoff der Substanz Wasser. Da zur Verdampfung von 1 g Wasser rund 600 cal.

gerechnet werden, so ist die Korrektur für den Wasserdampf $\frac{9H + W}{100}$

× 600 gleich, wenn H den Prozentgehalt an Wasserstoff, W den an hygroskopischem Wasser bedeutet.

Korrektur für den dampfförmigen Anteil leicht flüchtiger Flüssigkeiten. Wie bereits erwähnt, werden leicht flüchtige Flüssigkeiten, wie Benzol, Methylalkohol usw., in dünnwandige Glaskügelchen eingeschmolzen, die nach dem Füllen der Bombe mit Sauerstoff zertrümmert werden, wodurch ein Gemisch aus dampfförmiger und flüssiger Substanz entsteht. Die Wassermenge für den dampfförmigen Anteil berechnet sich in folgender Weise:

Es wird beispielsweise die Verbrennungswärme des Benzols bestimmt. Der Innenraum der Bombe beträgt z. B. 294 ccm; 1 Liter Benzoldampf von 160° C wiegt 3,300 g; die Tension des Benzoldampfes bei 16° ist 60 mm, folglich faßt die Bombe 0,0766 g gesättigten Benzoldampf; die Verdampfungswärme des Benzols beträgt für die hier in Betracht kommenden Temperaturen 8823 cal. für das Molekül, folglich ist von der gefundenen Verbrennungswärme folgende Korrektur in Abzug zu bringen

$$0,0766 \cdot \frac{8823}{78} = 8,7 \text{ cal.}$$

10. Beispiel einer kalorimetrischen Bestimmung.

a) Verbrennung von Zitronensäure.



(Die Substanz brennt nicht ohne Zusatz von Naphtalin.)

		Vorperiode			Hauptperiode			Nachperiode
1	τ_1	0,674	5	ϑ_0	0,676	9	τ'_1	4,046
2	τ_2	0,676	6	ϑ_1	2,600	10	τ'_2	4,034
3	τ_3	0,676	7	ϑ_2	3,760	11	τ'_3	4,020
4	τ_4	0,676	8	ϑ_3	4,006	12	τ'_4	4,004
5	τ_5	0,676	9	ϑ_4	4,046	13	τ'_5	3,992
						14	τ'_6	3,980

Hiernach wird:

$$\tau = \frac{0,674 + 0,676 + 0,676 + 0,676 + 0,676}{5} = 0,6756$$

$$\tau_1 = \frac{4,046 + 4,034 + 4,020 + 4,004 + 3,992 + 3,980}{6} = 4,0127$$

$$\tau_1 - \tau = 4,0127 - 0,6756 = 3,3371$$

$$v = \frac{0,676 - 0,674}{4} = 0,0005$$

$$v_1 = \frac{3,980 - 3,046}{5} = -0,132$$

$$v - v_1 = 0,0005 + (-0,132) = 0,0137$$

$$\frac{\vartheta_0 + \vartheta_n}{2} = \frac{0,676 + 4,046}{2} = 2,361$$

$$\frac{\vartheta_1 - \vartheta_0}{9} = \frac{2,600 - 0,676}{9} = 0,2138$$

$$\begin{aligned} \frac{1}{n-1} \sum \vartheta r &= \frac{1}{n-1} \sum \vartheta + \frac{\vartheta_1 - \vartheta_0}{9} = 0,676 + 2,600 + 3,760 + 4,006 + 0,2138 \\ &= 11,2558 \end{aligned}$$

$$n\tau = 0,6756 \times 4 = 2,7024$$

$$nv = 0,0005 \times 4 = 0,002.$$

Setzt man diese Werte in die Gleichung ein, so ergibt sich:

$$\Sigma \Delta \tau = \frac{0,0137}{3,3371} (11,2558 + 2,361 - 2,7024) - 0,002 = + 0,0441^0.$$

Also die wahre Temperaturerhöhung $T + \Sigma \Delta \tau$ beträgt:

$$4,046 - 0,676 + 0,0441 = 3,4141^0 \text{ C.}$$

Die beim Verbrennen der Substanz entwickelte Wärmemenge

$$(T + \Sigma \Delta \tau) \times W = 1098,98 \times 3,4141 \dots\dots\dots = 3752,00 \text{ cal.}$$

Davon geht ab für den Blumendraht 14,97 cal.

für Salpetersäurebildung . . . 3,79 „ 18,76 „

für 0,1272 g Naphtalin 1175,64 „

1,1340 g Zitronensäure liefern 2557,60 cal.

1,0000 g „ „ 2255,40 „

Die Brennwärme eines Moleküls wasserhaltiger Zitronensäure (210) beträgt: $2255,4 \times 210 = 473,627 \text{ Cal.}$

b) Verbrennung von Dichlorbenzol $C_6H_4Cl_2$ (Berthelot)

1. Gewicht des angewandten Dichlorbenzols . . . 0,7404 g
2. Gewicht des Kampfers 0,3823 g
3. Temperaturerhöhung des Kalorimeters 2,873⁰
4. Korrektur für Abkühlung 0,036⁰
5. Wahre Temperaturerhöhung 2,909⁰

Wasserwert des Apparates	2437,3
Gesamtwärme	7092,5 cal.
Menge des oxydierten As_2O_3	0,312 g
Menge des gebundenen Sauerstoffs	0,050 g
Menge der gebildeten Salpetersäure	0,132 g
Mit Hilfe dieser Zahlen erhält man folgende Wärmewerte:	
Brennwärme des Eisens	22,4 cal.
Brennwärme des Kampfers	3550,8 cal.
Oxydationswärme $\text{As}_2\text{O}_3 + \text{O}_2$	123,0 cal.
Bildungs- und Lösungswärme der Salpetersäure	30,0 cal.
	3726,2 cal.

Zieht man diese Zahl von 7092,5 ab, so erhält man die Wärmemenge von 3366,3 cal. für 0,7404 g Substanz und für 1 g Dichlorbenzol 4546,1 cal.

Die Brennwärme einer Grammolekel (147 g) Dichlorbenzol ist bei konstantem Volumen 667,7 Cal., berechnet nach folgender Gleichung:



und bei konstantem Druck 668 Cal.

11. Wasserwert des Apparates.

Unter Wasserwert des Apparates versteht man diejenige Menge Wärme, um die sich das Kalorimeter mit allen zugehörigen Teilen — Bombe, Rührer, Thermometer — bei der Verbrennung erhöht, ausgedrückt in äquivalenter Menge Wasser. Auf eine genaue Ermittlung dieser Konstante ist besonderes Gewicht zu legen, da sich sonst ein hier gemachter Fehler durch alle Bestimmungen zieht.

Berthelot bestimmte den Wasserwert nach der Mischungs-methode, indem er die Bombe in das Wasser des Kalorimeters brachte und eine bestimmte Menge Wasser hinzufügte, das vorher auf etwa 60° C erwärmt worden war. Stohmann, Kleber und Langbein bestimmten nach dieser Methode den Wasserwert der einzelnen Teile des Apparates — Kalorimeter, Bombe, Rührwerk und Thermometer — und verglichen den so gefundenen Wasserwert mit der Zahl, die sich als Produkt der Masse und der spezifischen Wärme ergibt. Die Berechnung aus der spezifischen Wärme der angewandten Metalle ist nur dann sicher, wenn man die spezifische Wärme des angewandten Stahls resp. Flußeisens genau kennt.

Viel einfacher und bequemer gestaltet sich die Methode, nach der eine bekannte Menge irgendeiner chemisch reinen Verbindung, deren Wärmewert genau ermittelt ist, verbrannt und aus dem Temperaturzuwachs, den das Wasser erfährt, der Wasserwert des Apparates abgeleitet wird. Dieses Verfahren bietet noch den Vorzug, daß man den Wasserwert unmittelbar in einer Operation

und unter gleichbleibenden Bedingungen wie beim späteren Arbeiten bestimmt.

Neuerdings haben Jäger und Steinwehr¹⁾ den Vorschlag gemacht, den Wasserwert des Apparates in der Weise zu bestimmen, daß man der Bombe und dadurch auch dem Kalorimeterwasser eine bestimmte Wärmemenge zuführt und die Temperaturerhöhung beobachtet. Dies erreicht man am zweckmäßigsten mittels des elektrischen Stromes, der während einer genau bemessenen Zeit durch eine um die Bombe gewickelte, aus einem sehr dünnen und nur wenige Millimeter breiten Konstantanstreifen bestehenden Spule läuft und sie erwärmt. Aus der Stärke, Spannung und Zeitdauer des Stromes, sowie aus dem vorher genau festgestellten Widerstand des Konstantanstreifens wird die auf diese Weise zugeführte Wärmemenge berechnet.

Folgende Verbindungen sind leicht rein zu erhalten:

Rohrzucker	3986,0 cal. pro g
Salizylsäure	5269,2 „ „ „
Phtalsäureanhydrid	5299,6 „ „ „
Hippursäure	5668,2 „ „ „
Benzoessäure	6322,1 „ „ „
Benzoin	7883,4 „ „ „
Kampfer	9291,1 „ „ „

Der Wasserwert des Apparates wird nach folgender Formel berechnet.

$$Q = \frac{W}{t} - a,$$

worin W die gesamt erzeugte Wärmemenge, t die beobachtete Temperaturerhöhung des Apparates samt seiner Wasserfüllung und a die im Kalorimeter angewandte Wassermenge.

$\frac{W}{t}$ entspricht der Zahl von Kalorien, die dem Apparate, samt der Wasserfüllung, zugeführt werden muß, um diesen um 1° zu erwärmen, und das ist sein Wasserwert. Der Wasserwert des leeren Apparates wird erhalten, wenn man die Menge des im Kalorimeter befindlichen Wassers abzieht. $\frac{W}{t} - a$.

Hat man z. B. 0,6775 g Hippursäure verbrannt, in das Kalorimeter 2200 g Wasser eingefüllt und ist die beobachtete Temperaturerhöhung 1,5392° C, so ergibt sich:

Verbrennungswärme der Hippursäure:	$0,6675 \times 5668,2 = 3840,20$ cal.
Eisendraht	14,56
Salpetersäure	16,64

¹⁾ Jäger und Steinwehr, Bestimmung des Wasserwertes eines Berthelotschen Kalorimeters in elektrischen Einheiten. Verhandl. d. Deutschen physik. Gesell. 5, 50 (1903).

Gesamterzeugte Wärmemenge	3871,40 cal.
Pro 1 ^o erzeugte Wärmemenge	2515,00 cal.
Angewandte Wassermenge	2200 g
Wasserwert des Apparates	315 g

$$Q = \frac{3871,40}{1,5392} - 2200 = 315.$$

Man verbrennt auf solche Weise drei bis vier verschiedene Verbindungen und nimmt bei guter Übereinstimmung das Mittel.

12. Verbrennung bei konstantem Druck und konstantem Volumen.

Die bei der Verbrennung einer Substanz in der kalorimetrischen Bombe gefundene Wärmemenge bezieht sich auf konstantes Volumen und unterscheidet sich von derjenigen, die beim Verbrennen im Sauerstoffstrom bei konstantem atmosphärischen Druck erhalten wird. Es ist leicht, aus den Werten, die man nach der einen Methode erhielt, die Werte abzuleiten, die man nach der anderen erhalten würde. Zur Berechnung dieser Werte hat Berthelot folgende Formel aufgestellt:

$$Q_{Tp} = Q_{Tv} + 0,5424 (N - N') + 0,002 (N - N')t$$

In dieser Formel bedeutet Q_{Tp} die Wärmemenge, die bei konstantem Druck entsteht und Q_{Tv} die durch dieselbe Reaktion erzeugte Wärme, die bei derselben Temperatur und bei konstantem Volumen stattfindet. N gibt die Zahl der Moleküle an, die in die Reaktion treten, wobei das Volumen, das von einem gasförmigen Grammmolekül eingenommen wird, gleich 22,32 Liter bei 0° und unter normalem Druck angenommen wird; N' ist die Zahl der Moleküle, die von den Reaktionsprodukten eingenommen werden.

Bei Anwendung dieser Formel sind zwei Fälle zu unterscheiden, je nachdem Gase oder feste und flüssige Körper vorliegen.

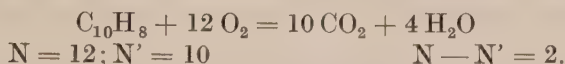
Berechnet man z. B. die Verbrennungswärme des Kohlenoxyds bei 15° und konstantem Volumen, so erhält man $CO + O = CO_2 + 68,0$ Cal.

Leitet man aus diesem Wert die bei konstantem Druck entstehende Wärmemenge, so muß man berücksichtigen, daß CO ein Volumen und O ein halbes Volumen einnimmt, folglich ist $N = 1\frac{1}{2}$. Die bei der Verbrennung gebildete CO_2 nimmt ein Volumen ein, $N' = 1$, so daß $N - N' = + \frac{1}{2}$. Der Unterschied zwischen den Verbrennungswärmen bei konstantem Druck und bei konstantem Volumen ist bei 0°

$$+ 0,542 \times \frac{1}{2} = + 0,27 \text{ Cal.}$$

Bei 15° muß man zu dieser Zahl noch + 0,015 hinzuaddieren, wodurch die Korrektur gleich + 0,285 Cal. und die Verbrennungswärme des Kohlenoxydes bei konstantem Druck und 15° = + 68,29 Cal. wird.

Bei der Verbrennung fester oder flüssiger Körper können die Volumina derselben gegenüber dem Volumen des Sauerstoffes vernachlässigt und das Volumen des beim Verbrennen gebildeten flüssigen Wassers ebenfalls vernachlässigt werden. Es handelt sich somit um die Bestimmung der bei der Verbrennung stattfindenden Zu- oder Abnahme des Volumens der Gase, d. h. um die Vergleichung der Volumina des verbrauchten Sauerstoffes und der gebildeten Kohlensäure. Ist die verbrannte Substanz z. B. Naphtalin, so haben wir



Die Differenz der Verbrennungswärmen des Naphtalins bei 0° ist $0,542 \times 2 = 1,084$; bei 15° : $+ 1,084 + 0,06 = 1,144$ Cal. Diese Zahlen beziehen sich auf die Molekulargewichte.

Ist das Molekulargewicht der verbrannten Substanz unbekannt, wie z. B. beim Albumin, so bietet die Differenzbestimmung keine Schwierigkeit, denn es genügt, das Volumen des zur Verbrennung verbrauchten Sauerstoffes und der hierbei gebildeten Kohlensäure sowie des eventuell entstandenen Stickstoffes zu kennen. Der Vergleich dieser Volumina, reduziert auf 0° und 760 mm Druck, mit dem von einem Molekül (22,33 Liter) Gas eingenommenen Volumen gestattet den Unterschied der bei konstantem Volumen und bei konstantem Druck erzeugten Wärmemengen mit genügender Genauigkeit zu berechnen.

Stohmann, Kleber und Langbein¹⁾ machen auf folgende allgemeine Regeln aufmerksam:

1. Bei allen Körpern, die im Molekül auf je zwei Wasserstoffatome je ein Sauerstoffatom enthalten, ist die Verbrennungswärme bei konstantem Volumen und bei konstantem Druck gleich.

2. Bei allen Körpern, die im Molekül mehr Wasserstoffatome enthalten, als der im Molekül vorhandene Sauerstoff zu oxydieren vermag, ist die Verbrennungswärme bei konstantem Druck größer als bei konstantem Volumen.

3. Bei allen Körpern, die im Molekül mehr Sauerstoffatome enthalten, als dem zu verbrennenden Wasserstoff entspricht, ist die Verbrennungswärme bei konstantem Druck geringer als bei konstantem Volumen.

D. Organische Elementaranalyse.

1. Qualitative Analyse organischer Verbindungen.

Kohlenstoff. Die Gegenwart von Kohlenstoff erkennt man am „Verkohlen“ beim Erhitzen der Substanz im Glasrohr oder auf einem Platinblech oder beim Übergießen mit konzentrierter Schwefelsäure. Leitet man die Dämpfe unzersetzt siedender Kohlenstoffver-

¹⁾ Stohmann, Kleber und Langbein, Methode der Verbrennung organischer Substanzen, Journ. für prakt. Chemie. **39**, 524 (1889).

bindungen durch ein glühendes Rohr, so scheidet sich Kohlenstoff ab. Läßt sich der Kohlenstoff mittels dieser Methoden nicht nachweisen, so oxydiert man die Verbindung durch Erhitzen mit Kupferoxyd, wodurch der Kohlenstoff in Kohlendioxyd und der zugleich anwesende Wasserstoff in Wasser übergeführt wird.

Stickstoff. Stickstoffhaltige Körper verbreiten beim Verbrennen den bekannten Geruch gesengter Haare oder Federn unter Entwicklung von Ammoniak, das durch Reaktion, Geruch leicht zu erkennen ist.

1. Man erhitzt in einem trockenen Reagenzglas einige Körnchen der trockenen Substanz mit einem Stückchen vollständig blanken, freien, von Kruste und zwischen Papier getrockneten metallischen Kaliums über freier Flamme zuerst vorsichtig, dann stärker, bis das Reagensglas deformiert ist, wobei sich Zyankalium bildet, das man wie folgt nachweist. Das noch heiße Rohr wird in 12—15 ccm kaltem Wasser abgelöscht, die wässrige Lösung filtriert, mit drei bis vier Tropfen einer Ferroferrilösung versetzt, wobei die Reaktion noch alkalisch sein muß, erhitzt zum Sieden und nach dem Erkalten mit Salzsäure übersättigt. In Gegenwart von Stickstoff entsteht eine blaue Lösung, aus der sich blaue Flocken von Berlinerblau ausscheiden; bei Spuren von Stickstoff entsteht eine schwachgrüne Lösung, die nach einigen Stunden einen geringen Bodensatz von Berlinerblau ausscheidet.

2. Wird die zu prüfende Substanz mit 6 Teilen Natronkalk in einem Reagensglas geglüht, so entweicht Ammoniak, das man durch Blaufärbung von feuchtem roten Lackmuspapier oder durch die Nebelbildung an einem mit Salzsäure befeuchteten Glasstab, den man dem Reagensglas nähert, erkannt.

Halogene. Die Beilsteinsche Probe besteht darin, daß man ein linsengroßes Stück oder ein $\frac{1}{2}$ cm langes Stäbchen Kupferoxyd mit einem dünnen, in ein Glasrohr eingeschmolzenen Platindraht umwickelt und glüht, bis die Flamme farblos erscheint. Nach dem Erkalten bringt man die zu untersuchende Substanz auf das Kupferoxyd und erhitzt, so verbrennt zuerst der Kohlenstoff und es tritt eine leuchtende Flamme auf, die nach kurzer Zeit grün oder blaugrün wird. Diese Farbe rührt vom verdampfenden Halogenkupfer her. Die Dauer der Färbung läßt auf die Anwesenheit einer größeren oder geringeren Menge Halogen schließen.

Der Nachweis des Halogens geschieht in der Weise, daß man 1—2 g der Substanz mit einem erbsengroßen Stückchen Natrium in einem Rohre aus schwer schmelzbarem Glase erhitzt, bis die Substanz vollständig verbrannt ist. Hierauf taucht man das bis zur Rotglut erhitzte Röhrchen noch heiß in ein Becherglas mit etwas Wasser, wobei das Röhrchen unter Entzündung des übrig gebliebenen Natriums zerspringt. Das so erhaltene Halogennatrium wird durch Versetzen mit Silbernitrat nachgewiesen.

3. Durch Erhitzen mit Kalk. Man bringt in eine 25 cm lange und 1 cm weite, an einem Ende zugeschmolzene Röhre eine kurze Schicht von chlorfreiem, körnigem Kalk, dann die mit Kalk verriebene Substanz und hierauf eine längere Schicht von körnigem Kalk. Man legt die so beschickte Röhre, nachdem man durch leises Klopfen einen Kanal zwischen der oberen Röhrenwand und der Beschickung erzeugt hat, horizontal in einen Gasofen und erhitzt zuerst die hinterste Schicht und dann allmählich vorschreitend, bis der ganze Inhalt der Röhre dunkelrotglühend geworden ist. Die Substanz wird dabei zerstört, und das Halogen verbindet sich mit dem Chlorkalk zu Halogenkalzium. Der abgekühlte Inhalt wird in verdünnter Salpetersäure gelöst, filtriert und das

Filter mit Silbernitrat auf Halogen geprüft. Das Halogensilber kann auch quantitativ bestimmt und daraus die Menge Halogen berechnet werden.

Schwefel. Die beim Veraschen der Substanz mit dem Soda-Salpetergemisch entstehende Kalium- und Natriumsulfid geben mit Natriumnitroprussidlösung eine violette Färbung oder mit Bleiazetatlösung in essigsaurer Lösung eine braune oder schwarze Färbung.

De Negri und Fabris verfahren nach dem von Martho herrührenden und von ihnen modifizierten Verfahren derart, daß sie 5 g Fett mit 20 ccm einer 5prozentigen Lösung von Kalihydrat in 90prozentigem Alkohol bis zur vollständigen Verseifung erwärmen, in wenig Wasser lösen und mit 2 ccm einer wässerigen, 20prozentigen Silbernitratlösung versetzen. Hierauf wird verdünnte Salpetersäure hinzugefügt und erwärmt, bis die Fettsäuren aufschwimmen, wobei man bei Gegenwart von Schwefel eine dünne, schwarze Schicht zwischen den Fettsäuren und der Unterlage beobachtet, die auch beim Umrühren und längerem Erhitzen nicht verschwindet.

Ist Schwefel in Form von freier Schwefelsäure vorhanden, so wird diese mit warmem Wasser ausgezogen und mit Bariumchlorid nachgewiesen. Schwefelsäureester, die in den durch Schwefelsäure raffinierten Ölen vorkommen, werden mit Salzsäure gekocht und mit Bariumchlorid geprüft.

Kocht man mit alkalischer Bleioxydlösung, so entsteht in Gegenwart von Schwefel braunes Schwefelblei.

Phosphor. Die mit dem Gemisch von Soda und Salpeter hergestellte Schmelze wird in verdünnter Salpetersäure gelöst, etwas konzentrierte Ammoniumnitratlösung hinzugefügt, bis zum Sieden erhitzt und mit molybdänsaurem Ammonium versetzt, wobei sich bei Gegenwart von Phosphor ein kanariengelber, kristallinischer Niederschlag ausscheidet, der in Ammoniak löslich ist.

In derselben Weise, nur in der Hitze, wird auch Arsen nachgewiesen.

Der freie Phosphor wird qualitativ am besten nach dem Mitscherlich'schen Verfahren¹⁾ nachgewiesen, bei dem Verflüchtigung des Phosphors mit Wasserdampf erfolgt. Die Erhitzung des Phosphoröles geschieht in einem Kolben mit Rückflußkühler, wobei sich im aufgesetzten Kühlrohr bei Gegenwart von Phosphor im Dunkeln ein intensives Leuchten zeigt.

Arsen. Metallisches Arsen verbrennt unter Verbreitung eines Knoblauchgeruchs; mit Soda gemengt und auf der Kohle erhitzt, geben alle Arsenverbindungen diesen Geruch.

Nach Marsch verfährt man in der Weise, daß man eine geringe Menge der zu untersuchenden Substanz mit einem kleinen Stückchen chemisch reinen Zinks mit etwas Salzsäure übergießt, wobei sich in Gegenwart von Arsen Arsenwasserstoff entwickelt. Beim Durchleiten dieses Wasserstoffs durch eine an einem Ende verengte Röhre bis zur vollständigen Füllung und bei darauffolgendem Erhitzen dieser Stelle bildet sich ein schwarzer Fleck (Arsenspiegel).

II. Quantitative Bestimmung organischer Verbindungen.

a) Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs nach Liebig.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß die organische Substanz mit Hilfe von Sauerstoffüberträgern, wie Kupferoxyd oder anderen beim Glühen Sauerstoff übertragenden Mitteln, wie Bleichromat, Platinasbest usw., vollständig oxydiert wird und die dabei entstehenden Verbrennungsprodukte Kohlendioxyd in Kalilauge oder Natronlauge und das Wasser in einem Chlorkalziumrohr aufgefangen und bestimmt werden.

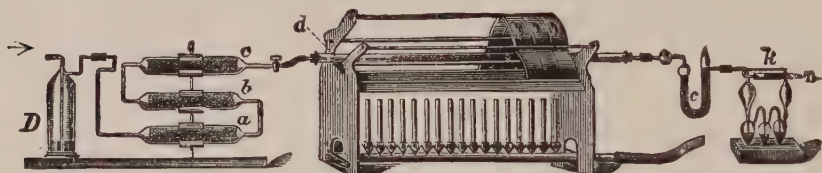
Feste Substanzen werden mit festem Kupferoxyd gemischt oder in Porzellan- oder Platinschiffchen im offenen Luft- oder Sauerstoff

¹⁾ Mitscherlich, Forschungsab. über Lebensmittel und ihre Beziehung zur Hygiene 4, 241.

verbrannt, Flüssigkeiten werden vorher in dünne Glaskügelchen eingeschmolzen. Bei stickstoffhaltigen Substanzen legt man, um das Auftreten von Oxyden desselben in den Verbrennungsgasen zu verhindern, eine zum Glühen erhitzte Kupferspirale vor. Ist die Substanz schwefel- oder halogenhaltig, wird geschmolzenes Bleichromat statt Kupferoxyd verwendet, damit kein Chlor- Schwefelsäureanhydrid usw. in die Kalilauge gelangt, sondern als Bleisulfat, Bleichlorid usw. zurückbleibt. Liegen nur Halogene vor, aber kein Schwefel, so verbrennt man mit Kupferoxyd unter Vorlegen einer kühl gehaltenen Kupfer- oder Silberspirale, die die Halogene bindet. Sind Alkalien oder alkalische Erden zugegen, die die Kohlensäure zurückhalten, wendet man Bleichromat und ($\frac{1}{10}$) Kaliumbichromat an, damit die freiwerdende Chromsäure die Kohlensäure austreibt.

Erforderliche Apparate und Reagenzien:

1. Ein beiderseits offenes, schwer schmelzbares Glasrohr von 12—15 mm Weite; das Rohr muß 10 cm länger sein als der Verbrennungssofen. Fig. 31.



Trockenapparat.

Fig. 31.
Verbrennungsofen.

2. 400 g granuliertes Kupferoxyd, das in einem mit verengtem Halse versehenen Kolben aufbewahrt werden muß.

3. Zwei gerade Chlorkalziumröhren und ein U-förmig gebogenes Chlorkalziumrohr, der Geisslersche Kaliapparat. Fig. 33.

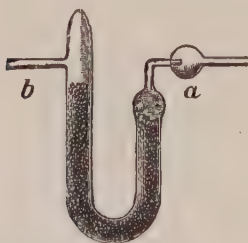


Fig. 32.
Chlorkalziumrohr.

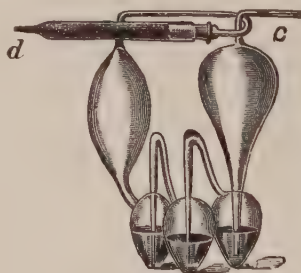


Fig. 33.
Geißlerscher Kaliapparat.

4. Ein Trockenapparat. Fig. 32.
5. Ein Geißlerscher Kaliapparat oder zwei Natronkalkröhren.
6. Zwei Asbestplatten zum Schutze der in den beiden Enden des Verbrennungsofens befindlichen Gummipfropfen.

Vorbereitung und Verbrennung.

1. Das Kupferoxyd wird in einem eisernen Tiegel eine halbe Stunde gegläht, um die anhaftende Feuchtigkeit zu beseitigen, und noch warm in den Kolben gebracht, der mit einem Chlorkalzium verschlossen wird, um das Kupferoxyd vor Feuchtigkeit zu schützen.

2. Die am Gebläse an beiden Enden rundgeschmolzene Verbrennungs-

röhre wird mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen, die letzten Spuren von Äther verjagt.

3. Das gefüllte Chlorkalziumrohr und der Kaliumapparat werden vor dem Wägen einige Zeit im Gehäuse der Wage liegen gelassen und unmittelbar vor dem Wägen mit einem ganz reinen, nicht fasernden Tuch abgewischt, wobei man die Kautschukverschlüsse entfernt, aber nach der Wägung wieder aufsetzt.

Die Füllung des Verbrennungsrohres geschieht in der Weise, daß man zunächst eine Kupferdrahtnetzspirale K in das rechte Ende in einer Entfernung von 5–6 cm hineinschiebt, dann eine 45 cm lange Schicht grobkörnigen Kupferoxyds (K) hineinfüllt und durch eine zweite festsitzende Kupferdrahtnetzspirale k^1 abschließt. Hierauf schiebt man eine 10 cm lange Kupferdrahtnetzspirale d so weit hinein, daß ein 10 cm langer Raum s entsteht, und legt das so beschickte Rohr in den Verbrennungssofen so, daß es auf beiden Seiten des Ofens 5 cm hervorragt. Das linke Ende des Verbrennungsrohres wird mittels eines mit einem 5 cm langen Glasröhrchen versehenen, gut schließenden Glasstopfens und Gummischlauches mit dem Trockenapparat verbunden. Das rechte Ende des Rohres bleibt offen.



Fig. 34.
Verbrennungsrohr.

Nun zündet man die Flammen des Ofens an, zunächst ganz klein geschraubt, erhitzt, unter Durchleitung eines ganz langsamen Stromes absolut reinen, wasserstofffreien Sauerstoffs, das Rohr der ganzen Länge nach gleichmäßig und steigert allmählich die Hitze, bis bei aufgelegten Kacheln das Kupferoxyd eben beginnt dunkelrotglühend zu werden. Das sich in dem rechten offenen Ende des Verbrennungsrohres kondensierende Wasser wird durch Überhalten eines heißen Kachels verjagt und, sobald sich Sauerstoff am rechten Ende des Rohres nachweisen läßt, leitet man durch die Röhre Luft bis zur vollständigen Verdrängung des Sauerstoffs. Nun schließt man das rechte Ende der Röhre mit einem Chlorkalziumrohr mittels eines einfach durchbohrten Gummistopfens, dreht die Flammen unter der linken Hälfte des Verbrennungsrohres aus und stellt den Luftstrom ab, während die Flammen unter der rechten Hälfte brennen bleiben.

Nach dem Erkalten entfernt man den Pfropfen vom linken Ende des Verbrennungsrohres, zieht die Kupferspirale mittels eines hakenförmigen Drahtes heraus, schiebt das Schiffchen mit der Substanz und darauf die Spirale in das Rohr hinein, stellt die Verbindung mit dem Trockenapparat wieder her und schaltet das eben gewogene Chlorkalziumrohr und den Kaliapparat ein. Hierauf wird der zwischen Trockenapparat und Verbrennungsröhre befindliche Quetschhahn ganz geschlossen, mit einem Luftgasometer verbunden, der Glashahn des Trockenapparates vollständig geöffnet, der Quetschhahn nur wenig geöffnet, so daß die Blasenentwicklung im Kaliapparat höchstens

drei Blasen pro Sekunde erreicht. Nun zündet man die zwei äußersten Brenner links an, läßt sie ganz klein brennen und erhitzt allmählich die Kupferoxydspirale *d* bis zur beginnenden Rotglut, schreitet mit dem Erhitzen von links nach rechts fort, wobei die Gasentwicklung nicht mehr als höchstens vier Blasen pro Sekunde beträgt, was sich leicht mittels des Quetschhahnes und durch Kleinschrauben der Flammen regulieren läßt. Schließlich erhitzt man bei bedeckten Kacheln bis zur Dunkelrotglut, und die Verbrennung ist dann beendet. Man tut aber gut, wenn man durch die Röhre noch beim Glühen Sauerstoff durchleitet, bis er am Ausgange des angebrachten Chlorkalziumrohres durch einen glimmenden Spahn nachgewiesen werden wird. Jetzt vertreibt man bei ausgemachten Flammen den überschüssigen Sauerstoff durch einen Luftstrom. Das vorn in der Verbrennungsröhre kondensierte Wasser treibt man durch Unterhalten einer heißen Kachel in das Chlorkalziumrohr hinüber. Nach 20 Minuten langem Stehen im Wagezimmer wägt man das sorgfältig abgetrocknete Chlorkalziumrohr und den Kaliapparat ohne Verschlüsse und berechnet aus dem gefundenen Wasser- und Kohlenstoffgehalt die Menge Wasserstoff und Kohlenstoff.

Berechnung: Substanz: 0,2045 g; Kohlensäure: 0,3151 = 42,03 Proz. C; Wasser: 0,1211 g = 6,64 Proz. H.

b) Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs in stickstoffhaltigen organischen Substanzen.

Bei der Verbrennung stickstoffhaltiger organischer Substanzen entstehen aus dem Stickstoff Stickstoffoxyde, die die Werte sehr beeinträchtigen, da sie vom Wasser der Chlorkalziumröhre und von der Kalilauge absorbiert werden. Man reduziert daher vor Austritt aus dem Verbrennungsröhr mit Hilfe einer blanken Kupferspirale, die man in der Weise herstellt, daß man ein 10 cm langes Kupferdrahtnetz in der Flamme eines Teclusbrenners glüht, noch heiß in ein 1—2 cm Methylalkohol enthaltendes Reagensglas wirft, wodurch das Kupfer unter heftigem Aufkochen zu metallischem Kupfer reduziert wird. Nachdem man nun die Spirale mittels einer Zange einigemal durch die Flamme des Teclusbrenners gezogen hat, schiebt man sie noch warm in das rechte Ende der Verbrennungsröhre hinein. Das Kupferoxyd wird in derselben Weise, wie angegeben, ausgeglüht und eingefüllt. Die Verbrennung selbst wird ausgeführt und verläuft wie bei den stickstofffreien Substanzen.

c) Bestimmung des Stickstoffs nach Dumas.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß die Substanz mit Kupferoxyd in einem Glasrohre verbrannt wird, wobei die mit dem Stickstoff entweichenden Stickoxyde durch glühende Kupferspirale reduziert werden. Die Verbrennung geschieht in einer Kohlendioxyd-

atmosphäre zum Zweck einer vollständigen Verdrängung der Luft aus dem Verbrennungsrohr.

Man bringt in ein 80 cm langes, an einem Ende zugeschmolzenes Rohr zuerst eine Schicht von 15 cm Natriumkarbonat, Magnesit, auch Mangankarbonat, am besten durch Hineinbohren des Rohrendes in die Pulverflasche, dann schiebt man mittels eines Glasstabes einen Pfropf aus gut ausgeglühtem faserigen Asbest bis dicht zum Bikarbonat, ohne ihn fest zu drücken, und füllt eine handbreite Schicht in einem eisernen Tiegel gut ausgeglühten drahtförmigen Kupferoxyds ein.

Hierauf befestigt man das Rohr vertikal in einem Stativ, füllt durch einen Kupfertrichter 4—5 cm gut ausgeglühtes, feingepulvertes Kupferoxyd, ferner die mit einer genügenden Menge Kupferoxyd innig gemischte Substanz, spült das Gläschen mehrmals mit etwas reinem Kupferoxyd nach, füllt das Rohr mit soviel drahtförmigem Kupferoxyd, daß noch ein Raum von etwa 20 cm bleibt, und schiebt die beiden Kupferspiralen, sowie einen Pfropfen aus Asbestfasern ein. Nun verbindet man das Verbrennungsrohr mit dem Gasleitungsrohr, stellt durch Aufklopfen des Rohres auf eine hölzerne Tischplatte einen

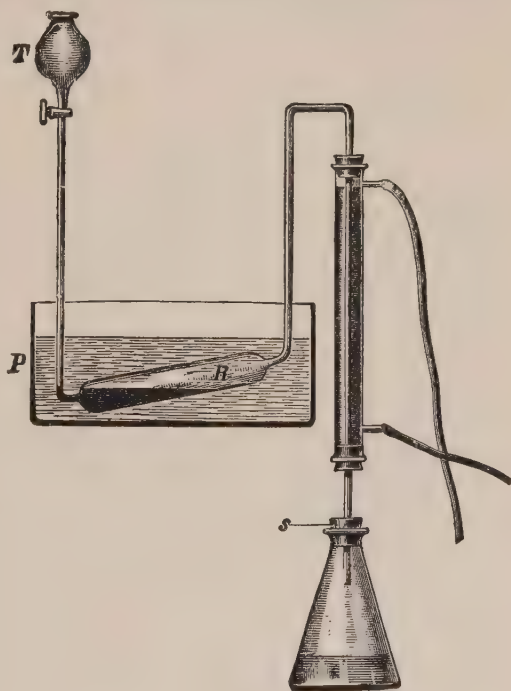


Fig. 35.

Kanal her und bringt das Rohr in den Verbrennungsofen. Nachdem man das Ableitungsrohr mit dem Absorptionsapparate (Fig. 35), in dem sich unten Quecksilber und weiter 30prozentige Kalilauge findet, verbunden hat, öffnet man den Quetschhahn bei tiefstehender Birne. Man erhitzt zunächst einen Teil des Natriumkarbonats mit kleiner Flamme, um durch Kohlensäure die Luft zu verdrängen, und wartet ab, bis die im Absorptionsapparat aufsteigenden Gasblasen aus reinem Kohlendioxyd bestehen, was man daran erkennt, daß sich in der völlig mit Kalilauge gefüllten Röhre kein Gasvolumen mehr ansammelt, wobei man während der Zeit den Glashahn öffnet und die Birne möglichst tief stellt, um nicht zu viel Kalilauge zu verbrauchen. Hierauf erwärmt man die Spiralen, um die Luft zu verdrängen, solange sich über der Kalilauge noch ein Luftvolumen bildet, treibt man es durch Heben der Birne und Öffnen des Hahnes aus. Man erhitzt

zuerst das drahtförmige Kupferoxyd, dann die Kupferspiralen und schreitet allmählich mit dem Erhitzen nach hinten zu fort, wobei die Glasblasen im Apparat im zählbaren Tempo aufsteigen müssen. Nach erfolgter Verbrennung, d. h. wenn nach Anzünden aller Flammen und Zudecken aller Kacheln, mit Ausnahme der bei dem Bikarbonat, keine Gasblasen mehr hochsteigen, wird der noch übrige Teil des Natriumkarbonats erhitzt und aller Stickstoff durch die Kohlensäure in die Bürette übergeführt. Wenn sich das Stickstoffvolumen bei wiederholtem Ablesen nicht mehr ändert, stellt man die Birne so hoch, daß die Oberfläche der Kalilauge überragt und läßt im Wagezimmer stehen. Man liest dann das Stickstoffvolumen, die Temperatur und den Barometerstand und berechnet den Stickstoff in Prozenten nach der Formel

$$N = V \cdot \frac{273}{273 + t} \cdot \frac{b - w}{760} \cdot 0,001256 \frac{100}{g},$$

wo V das Volumen des Stickstoffs, b den Barometerstand, t die Temperatur, w die Tension des Wasserdampfes, 0,001256 das Gewicht eines Normalkubikzentimeters Stickstoff und g das der angewandten Substanz bezeichnet.

d) Methode von Will und Varrentrapp.

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, daß beim Schmelzen resp. Verbrennen im Verbrennungsrohre stickstoffhaltiger Substanzen mit Natronkalk die ganze Menge des in ihnen enthaltenen Stickstoffs durch den freiwerdenden Wasserstoff in Ammoniak übergeführt wird, das man in einer abgemessenen Menge titrierter Salzsäure auffängt und titrimetrisch bestimmt. Diese Methode findet jetzt nur beschränkte Verwendung.

e) Quantitative Bestimmung der Halogene.

Die gebräuchlichsten Methoden zur Bestimmung der Halogene in organischen Substanzen basieren auf der Zersetzung der Substanz und darauffolgender Bestimmung als Halogensilber. Die Zersetzung geschieht in folgender Weise:

1. Verfahren von Liebig. Dieses besteht darin, daß die halogenhaltige organische Substanz mit Ätzkalk aufgeschlossen wird, wobei das Halogen quantitativ in Halogenkalzium übergeht, das man aus wässriger Lösung durch Silbernitrat fällt und als Halogensilber wägt.

Man bringt die fein pulverisierte und genau gewogene Substanz, etwa 0,20 g, in ein an einem Ende zugeschmolzenes 35 cm langes Rohr von 10 mm Durchmesser, wobei man das Rohr zuerst bis etwa $\frac{1}{3}$ mit Ätzkalk füllt, dann die Substanz im Wägegglas mit neuen Mengen Ätzkalk gut durchschüttelt und bis auf 3—4 cm nachfüllt. Man stopft dann den Kalk mit einem gut ausgeglühten Asbeststopfen fest, klopft

eine Rinne durch die ganze Länge der Röhre, die man unverschlossen mit der Rinne nach oben legt. Man erhitzt den vorderen Teil der Röhre und schreitet langsam gegen das geschlossene Ende vor; ein zu schnelles Erhitzen ist wegen Verpuffung zu vermeiden. Die Röhre muß bis zur hellen Rotglut erhitzt werden, was etwa 1 Stunde dauert.

Der Rohrinhalt wird mit Hilfe von Wasser und verdünnter Salpetersäure in ein Becherglas übergespült, mit Salpetersäure bis zur vollständigen Lösung versetzt und filtriert. Das Filtrat wird erhitzt, mit Silbernitratlösung gefällt, erhitzt bis zur vollständigen Ausscheidung, absetzen gelassen und durch ein gewogenes Filter oder einen Goochtiiegel filtriert und eine Stunde bis zur Gewichtskonstanz bei 120° C getrocknet.

2. Verfahren von Carius. Man bringt in ein Einschmelzrohr von 10 mm lichter Weite und 40—50 cm Länge mittels eines Trichterrohres 20—25 Tropfen reine rauchende Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,52 und 0,5 g kristallisiertes Silbernitrat. Die Substanz wird in einem 5—6 cm langen, 4—5 mm weiten Röhrchen aus Jenaer Glas, das an einer Seite rund abgeschmolzen ist, abgewogen. Öle werden mit Hilfe einer Kapillarpipette in ein Röhrchen, das mit Glasstopfen versehen ist, gebracht. Das Substanzgläschen wird in das Bombenrohr gebracht. Das schräggehaltene Rohr wird vor der Gebläseflamme vorsichtig angewärmt und zu einer gleichmäßig dickwandigen Kapillare ausgezogen, diese zugeschmolzen und in der leuchtenden Flamme gut abgekühlt. Das Rohr wird nun im Bombenofen auf 240—320° C etwa 2—3 Stunden erhitzt. Liegt reines Chlorsilber vor, wird es auf einem Goochschen Tiegel abfiltriert, getrocknet und gewogen. Liegt Jod- oder Bromsilber vor, so muß die Reaktionsflüssigkeit $\frac{1}{2}$ Stunde gekocht werden, um das Silbernitrat vollständig zu entfernen, da Brom- und Jodsilber mit dem salpetersauren Silberoxyd zu einer Doppelverbindung zusammenschmelzen, die beim Erkalten zu einer gelben undurchsichtigen Masse erstarrt. Bei der Analyse von Jodverbindungen empfiehlt es sich, keinen großen Überschuß an Silbernitrat zu verwenden. Dieses Verfahren ist insofern nachteilig, als es umständlich und nur bei höherem Halogengehalt verwendbar ist.

f) Bestimmung des Phosphors und Arsens.

Man erhitzt die Substanz im Erlenmeyerkolben mit etwa 5 ccm konzentrierter Salpetersäure und fügt nach und nach 2—3 g gepulvertes Kaliumpermanganat bis zur bleibenden Violettfärbung hinzu. Nun erhitzt man so lange, bis keine Stickoxyde mehr entweichen, läßt erkalten und versetzt die Lösung des Braunsteins tropfenweise mit einer 10prozentigen Kaliumnitritlösung bis die Flüssigkeit vollständig klar wird. Hierauf kocht man noch einmal auf und versetzt mit Molybdänlösung, löst den Niederschlag in Ammoniak und fällt mit Magnesiamixtur. Das gefällte Ammoniummagnesiumphosphat (Arsenat) wird durch Glühen in das Pyrophosphat (Pyroarsenat) übergeführt und als solches gewogen.

g) Elementaranalyse mittels der Berthelotschen Bombe.

Berthelot¹⁾ hat darauf hingewiesen, daß mit der Bombe auch Elementaranalysen ausgeführt werden können, die in bezug auf Genauigkeit den Elementaranalysen im Verbrennungsrohr nicht nachstehen, sogar, was den Wasserstoffgehalt betrifft, bedeutend sicherer sind. Besonders geeignet erscheint dieses Verfahren für die Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs in der Kohle, denn es bleiben leicht bei der Verbrennung im offenen, mit Bleichromat und Kupferoxyd gefüllten Rohr im Sauerstoffstrom unvollständig verbrannte Gase zurück.

Das von W. Hempel²⁾ ausgearbeitete Verfahren zur Bestimmung des Kohlenstoffs, Wasserstoffs, Schwefels und der Halogene besteht darin, daß die zu untersuchende Substanz in einer möglichst leichten und kleinen Bombe verbrannt wird, die gebildete Kohlensäure und Wasser gewogen wird, wobei man das Wasser teils in der Bombe, teils in einem Chlorkalziumrohr wägt. Etwa gebildete Schwefelsäure und die Halogene werden in der wässrigen Lösung wie gewöhnlich bestimmt, die Salpetersäure und etwaige andere Säuren werden durch Titration mit n_{100} -Alkalilauge ermittelt.

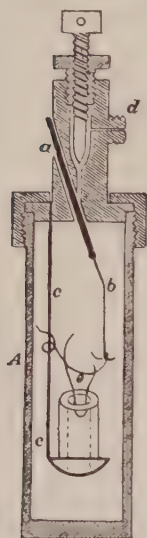


Fig. 36.
Bombe nach
Hempel.

Die für diese Zwecke konstruierte Bombe (Fig. 36) ist aus einem Stück ganz weichen Flußeisens gefertigt, das im Innern ausgebohrt und mit einer Emailleschicht bedeckt ist; die Wandstärke beträgt 2 mm. Die Bombe ist so gebaut, daß sie einen Druck bis 200 kg pro Quadratcentimeter zu ertragen vermag; sie faßt etwa 33 ccm, so daß sie bei 25 kg Druck pro Quadratcentimeter etwa 800 ccm Sauerstoff fassen kann. Der Deckel, der das Ventil enthält, wird mit einer Übermutter aufgeschraubt. Um die elektrische Zündung zu ermöglichen, ist durch das konische Loch a ein konischer Eisenstift mittels eines Gummischlauches eingedichtet; in dem Eisenstift ein starker Platindraht befestigt. Der in den Deckel eingeschraubte Platinlöffel dient zur Aufnahme der Substanz; in diesem Löffel steht ein oben und unten offener kleiner Hohlzylinder aus feuerfestem Ton, der durch einen kleinen Ring aus Platindraht vor dem Umfallen geschützt wird. Die Dichtung des Ventils geschieht mit Vulkanfiber (auch flexible Cellulvert genannt), die des Deckels mit einem Bleiring.

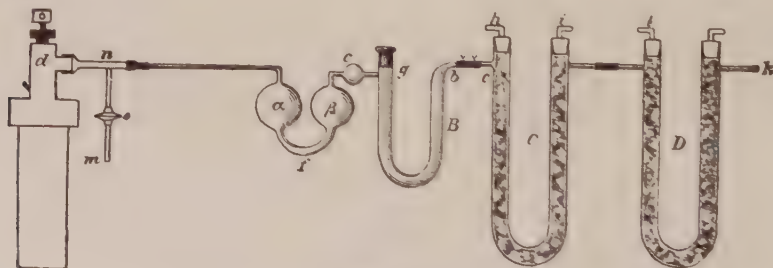


Fig. 37.
Absorptionsapparat mit der Hempelschen Bombe.

Da die Bombe nur auf etwa zwei bis vierfache Sicherheit hergestellt ist gegenüber den Drücken, die sich im Augenblick der Verbrennung entwickeln, so wird sie vor der Zündung in einen starken Eisenzylinder gestellt, der selbst

¹⁾ Berthelot, Sur une nouvelle methode d'analyse organique. Compt. rend. 1892, 317; 1899, 1002.

²⁾ W. Hempel, Die Elementaranalyse unter Druck in dem Autoklave. B. 30, 202 (1897).

im Falle eines Bruches die unbedingte Sicherheit bietet, daß niemand beschädigt werden kann. Dieser Zylinder dient gleichzeitig zum Festhalten der Bombe beim Zuschrauben dadurch, daß er mit drei Löchern versehen ist, in die passende Vorsprünge am Boden der Bombe eingreifen.

Der Absorptionsapparat (Fig. 37) besteht aus einem Chlorkalziumrohr, einem Natronkalkrohr und einem Sicherheitsrohr, das mit Chlorkalzium gefüllt ist, um den Zutritt von Feuchtigkeit in das Natronkalkrohr zu verhindern. Das Chlorkalziumrohr besteht aus einem Doppelkugelapparat $\alpha \beta$, in den man eine ganz geringe Menge konzentrierter Schwefelsäure bringt, so daß diese im Rohre einen Faden von etwa 5 mm Länge bildet, und dem eigentlichen Chlorkalziumrohr B , das man mit ausgesiebttem Chlorkalzium füllt. Das Natronkalkrohr wird an Stelle des gebräuchlichen Kaliapparates angewandt, da dieses ein intensiveres Evakuieren der Bombe ermöglicht, was zur vollständigen Entfernung der Kohlensäure sehr zweckmäßig ist. Hempel empfiehlt, auf die Anwendung eines guten Natronkalks besonderes Gewicht zu legen. Er hält es für zweckmäßig, den Natronkalk in einer eisernen Schale über freiem Kohlenfeuer in dem geöffneten Ringeinsatz eines gewöhnlichen Ofens zu erhitzen, wobei dafür gesorgt werden muß, daß die Flammgase die Schale nicht umspülen, so daß sie mit dem Natronkalk zusammenkommen.

Die Analyse wird in folgender Weise ausgeführt: Die sorgfältig getrocknete Bombe wird mit der zu untersuchenden Substanz beschickt, indem man die Pastille auf den Platinlöffel in den Tonzylinder stellt, die Enden des in die Pastille eingepreßten Zwirnfadens um einen zwischen c und b gespannten dünnen Platindraht schlingt, dann zugeschraubt und auf einer feinen Wage gewogen. Hierauf füllt man die Bombe mit Sauerstoff bis zu einem Druck von 25 Atmosphären und bringt sie dann in den Schutzzyylinder. Die Entzündung des Fadens erfolgt durch Glühen des Drahtes mittels eines elektrischen Stromes. Steht eine kleine Tauchbatterie zur Verfügung, so kann man es durch entsprechend geringes, in Vorversuchen ermitteltes Eintauchen so einrichten, daß ein und derselbe Platindraht ohne zu schmelzen für mehrere Versuche verwendet werden kann. Die Überführung der Verbrennungsprodukte aus der Bombe in die Absorptionsröhren erfolgt bei stickstofffreien Körpern nach einer halben Stunde, bei stickstoffhaltigen und bei allen schwefel- und halogenhaltigen Substanzen dagegen erst nach 2 Stunden, nachdem sich die in Form ganz feinen Flüssigkeitsstaubes in der Bombe schwebenden Säuren abgesetzt haben.

Mittels eines passenden Ansatzstückes wird an die Bombe bei d ein gewogenes Chlorkalziumrohr und Natronkalkrohr angeschlossen und das Ventil geöffnet, wobei Blase auf Blase die Absorptionsrohre durchstreicht. Nachdem der Überdruck herausgelassen ist, wird das Rohr k mit einer gewöhnlichen Wasserluftpumpe verbunden und der größte Teil der Gase aus der Bombe in den Absorptionsapparat übergeführt. Um nun den letzten Rest zu entfernen, schließt man den Hahn l , läßt bei m durch das Dreiwegestück n und durch den Hahn o einen langsamen Strom kohlensäure- und wasserfreier Luft zu und evakuiert dann nochmals. Eine zweimalige Wiederholung dieser Manipulation genügt, um die letzte Spur Kohlensäure aus der Bombe zu entfernen. Hierauf wird der ganze Apparat auseinandergenommen, das Chlorkalziumrohr und Natronkalkrohr gewogen, die Bombe geöffnet, mit Wasser gut ausgespült und durch Titration mit $n/100$ -Alkali und Phenolphthalein als Indikator die Menge der gebildeten Salpetersäure, Schwefelsäure usw. bestimmt.

In den meisten Fällen verbrennt die Substanz vollständig, bei sehr schwer brennbaren Körpern bleibt jedoch etwa 1 mg Kohle im Platinlöffel, deren Gewicht man in der Weise bestimmt, daß man den Löffel bei 105° C trocknet, wägt, dann kurze Zeit glüht und wieder wägt.

Bei stickstoffreichen Substanzen empfiehlt es sich, in die Bombe vor der Verbrennung etwa 1,5 g Wasser zu bringen, um die letzte Spur von Salpetersäure zurückzuhalten. Der Schwefel verwandelt sich vollständig in Schwefelsäure.

Die Korrektur für die aus der Verbrennung des Fadens herrührende Kohlensäure und das Wasser wird in der Weise ermittelt, das man in einem großen Stück Faden von etwa 1 m Länge durch Trocknen bei 105° den Gehalt an hygroskopischem Wasser und durch eine Verbrennung im Platintiegeld den Aschengehalt bestimmt; den Rest kann man dann als chemisch reine Zellulose in Rechnung setzen. Da 100 mm dieses Zwirnfadens nur etwa $2\frac{1}{2}$ mg wiegen, so kann man, ohne einen meßbaren Fehler zu machen, den Faden bei den Ver-

suchen später nur messen; man erhält so die Gewichte bis auf Hundertstel eines Milligrammes genau.

Hempel bringt folgendes Beispiel einer Berechnung.

Gehalt des Sauerstoffs (der bei einem Druck von 25 Atm. in die Bombe geht)	an Kohlensäure	0,0005 g
	„ Wasser	0,0015 g
10 ccm Zwirnfaden wiegt.		0,0022 g
Die bei der Verbrennung gebildete Kohlensäure wiegt		0,0031 g
Das „ „ „ „ Wasser „		0,0013 g

Die durch den Sauerstoff hinzugebrachte Menge Kohlensäure und Wasser dazugerechnet, ergibt 0,0036 g CO₂ und 0,0028 g H₂O.

Analyse einer chemisch reinen Salizylsäure (Hempel).

Gewicht der Salizylsäure	0,2593 g
„ des Fadens	0,0022 „
„ der Bombe + Salizylsäure + Faden	617,1010 „
„ „ „ nach der Verbrennung	616,9430 „
Gewichtszunahme des Chlorkalziumrohres	0,0040 „
„ „ „ Natronkalkrohres	0,5760 „
Gewicht des Platinlöffels + unverbrannte Kohle.	4,5851 „
„ „ „	4,5839 „
	unverbrannte Kohle 0,0012 g

Zur Titration des gebildeten N₂O₅ wurde angewandt 7 ccm n/100-Alkali, entsprechend 0,0039 g N₂O₅.

Zieht man die aus dem Sauerstoff und von dem Faden stammenden 0,0036 g CO₂ ab, so bildete sich demnach bei der Verbrennung von 0,2593 g Salizylsäure 0,5724 g CO₂, entsprechend einem Kohlenstoffgehalt von 60,2 Proz.; addiert man die 0,0012 g unverbrannten Kohlenstoffs hinzu, so erhält man theoretisch berechnet 60,87 Proz.

Die Menge des aus den 0,2593 g Salizylsäure gebildeten Wassers wird in folgender Weise berechnet.

Gewicht der Bombe + Salizylsäure + Faden	617,1010 g
„ „ „ „	0,2615 „
	Gewicht der Bombe 616,8395 g

Gewicht der Bombe nach der Verbrennung, also

+ Wasser + N ₂ O ₅	616,9430 g
Gewicht der Bombe	616,8395 „
„ des in der Bombe enthaltenen Wassers und der N ₂ O ₅	0,1035 g
„ des Wassers, das vom Chlorkalzium aufgefangen wurde	0,0040 g
	Gesamtwasser + N ₂ O ₅ . 0,1075 g

Hiervon sind 0,0028 g Wasser von dem Faden stammend und 0,004 g N₂O₅ abziehen, und man erhält somit bei der Verbrennung von 0,2593 g Salizylsäure 0,1007 g Wasser, entsprechend 38,9 Proz.; theoretisch berechnete Menge: 39,1 Proz. Wasser.

Kröker¹⁾ bestimmt das Wasser in den Brennstoffen, indem er diese zuerst in der kalorimetrischen Bombe verbrennt, die Bombe dann mit einem gewogenen Chlorkalziumrohr verbindet, in ein Ölbad stellt, dieses auf 105° C erhitzt und durch Einleiten eines trockenen Gasstromes durch das mit dem Platinrohr verbundene Ventil das Wasser in das Chlorkalziumrohr überführt und durch Wägung bestimmt.

Diese Art Bestimmung des Wassers muß deshalb als ungenau angesehen werden, weil sich bei der Verbrennung der schwefel- und stickstoffhaltigen Kohlen Schwefelsäure und Salpetersäure bilden. Es ist unmöglich, ein Gemisch von Schwefelsäure, Salpetersäure und Wasser durch einfaches Erhitzen auf 105° und Durchleiten eines Luftstromes so zu trennen, daß nur

¹⁾ Kröker, Bestimmung der nutzbaren Verbrennungswärme der Brennstoffe. Zeitschr. für Zucker (1896).

Wasser überdestilliert, die Schwefelsäure und Salpetersäure wasserfrei zurückbleiben.

Um diese Fehler zu beseitigen, schlug Langbein¹⁾ vor, das in der Bombe gebildete Wasser in einem mit Phosphorsäureanhydrid gefüllten Gläschen zu absorbieren. Im Hinblick darauf, daß die Hempelsche Bombe für kalorimetrische Zwecke nicht ohne Gefahr zu benutzen ist, daß ferner nur sehr wenig Substanz verbrannt werden kann, da die Bombe bei 25 Atmosphären 800 ccm Sauerstoff faßt, von denen nur 30 Proz. ausgenutzt werden dürfen, konstruierte Langbein²⁾ eine mit Platinblech ausgelegte Bombe von 80 cm Inhalt.

Die Bestimmung wird in folgender Weise ausgeführt. Man stellt in die Bombe ein kleines Gläschen mit Phosphorsäureanhydrid zur Absorption des Wassers; nach erfolgter Verbrennung leitet man die Gase durch Absorptionsröhren, die mit Schwefelsäure und Bimsstein resp. mit Natronkalk gefüllt sind (Fig. 38). Nachdem der Druck herausgelassen ist, evakuiert man, leitet kohlensäurefreie Luft durch, um alle Kohlensäure zu entfernen, was bei dreimaligem Wiederholen dieser Operation gelingt. Hierauf bringt man die evakuierte Bombe in ein Ölbad von 100° und läßt darin eine halbe Stunde stehen, worauf man noch einige Male evakuiert, ohne die Absorptionsröhren vorzulegen. Die Hauptmenge der gebildeten Salpetersäure wird durch das Phosphorsäureanhydrid in N_2O_5 verwandelt, das in der Wärme in Untersalpetersäure zerfällt. Der größte Teil der Schwefelsäure und eine geringe Menge Salpetersäure bleiben an den Wänden der Bombe und des Gläschens hängen; sie werden durch Titration bestimmt und berücksichtigt. Eine geringe Menge Schwefelsäure wird von Phosphorsäureanhydrid in SO_3 verwandelt.

Die Zündung geschieht mittels Zündschnur. Man stellt durch besondere Versuche fest, wieviel Wasser und Kohlensäure von Zündschnur und komprimiertem Sauerstoff herrühren. Leicht sublimierbare Substanzen, wie Naphtalin, vermischt man mit reiner ausgeglühter Kieselsäure, um die Verbrennung zu verlangsamen.

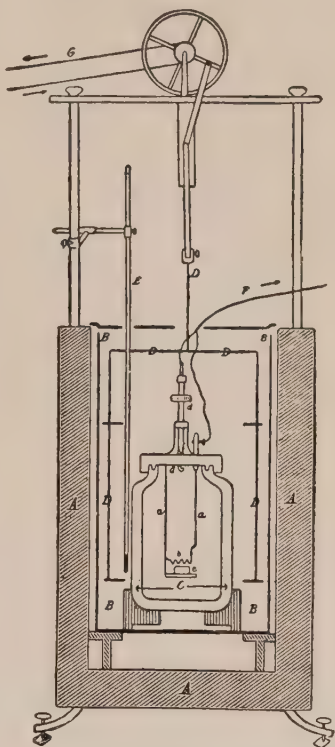


Fig. 38.
Elementaranalyse der
Berthelotschen Bombe.

Beispiel einer Elementaranalyse.

(Langbein.)

Substanz	0,2230 g, Benzoin $C_{14}H_{12}O_2$, Zündschnur	0,0159 g
Gewicht der Kohlensäure		0,6760 g
Korrektur für Zündschnur und Sauerstoff		0,0299 g
		CO_2 0,6461 g
0,2230 g Benzoin gaben	0,6461 g CO_2	= 79,02 Proz. C.

Die beim Ausspülen der Bombe mit destilliertem Wasser erhaltene Flüssigkeit brauchte zur Neutralisation 0,8 ccm $n/10$ -Barytwasser entspr. 0,0050 HNO_3 .

¹⁾ Langbein, Zeitschr. für öff. Chem.(1897), 76.

²⁾ Langbein, Chemische und kalorimetrische Untersuchungen von Brennstoffen. Zeitschr. für Ang. Chem. (1900), 1227.

	Wasser
Gewichtszunahme des Gläschens mit P_2O_5	0,1258 g
Gewichtszunahme des ersten Schwefelsäurerohres	0,0097 g
Die restierende HNO_3 enthielt	0,0007 g
	<u>H_2O 0,1362 g</u>
Korrektur für Zündschnur und Sauerstoff	0,0248 g
	<u>H_2O 0,1114 g</u>

0,2230 g Benzoin gaben 0,1114 g H_2O = 49,96 Proz. H_2O = 5,55 Proz. H
 Berechnet 79,25 C und 5,66 H
 Gefunden 79,02 C und 5,55 H.

Zuntz und Frentzel¹⁾ machten darauf aufmerksam, daß man beider Verbrennung einer Substanz in der kalorimetrischen Bombe eine direkte Messung des Sauerstoffverbrauchs ausführen kann, indem man die absolute Menge des vor und nach der Verbrennung in der Bombe enthaltenen Gases und dessen prozentische Zusammensetzung bestimmt. Die Ermittlung des Anfangsgases geschieht in der Weise, daß man die Bombe nach dem Einbringen der Substanz und dann nach dem Füllen mit reinem analysierten Sauerstoff wägt. Das Gewicht des Endgases ist gleich dem des Anfangsgases plus dem Gewicht der Substanz nach Abzug ihrer Asche, des gebildeten Wassers, der gebildeten Salpetersäure und ev. Schwefelsäure und der geringen Sauerstoffmenge, die der zur Zündung benutzte Eisendraht absorbiert. Das Bombengas läßt man nun durch eine genau geeichte Elstersche Gasuhr gehen und kontrolliert so das erhaltene Gewicht. Mittels eines in die Leitung eingeschalteten Zweivegehahnes leitet man einen Teil des Gases in Eudiometer, wo dieses gemessen und analysiert wird.

E. Blut.

1. Spezifisches Gewicht.

Das spezifische Gewicht des Blutes beim erwachsenen Menschen beträgt im Durchschnitt 1058 (beim Weibe niedriger), schwankt zwischen 1045 und 1075. Die Bestimmung geschieht mittels des Pyknometers. Verfügt man nur über eine geringe Menge Blut, so verfährt man nach Hammerschlag und Leo Zuntz²⁾ in der Weise, daß man ein kleines Becherglas von 10 cm Höhe und 5 cm Weite mit einem Gemisch von Chloroform und Benzol füllt, dessen spezifisches Gewicht mit dem zu erwartenden spezifischen Gewicht des Blutes nahe übereinstimmt, und einen Tropfen, am besten aus einem Stiche in der Fingerbeere, hineinfallen läßt. Steigt er an die Oberfläche, versetzt man unter leichtem Umschwenken mit Benzol, fällt er zu Boden, fügt man umgekehrt Chloroform zu, bis er gerade schwimmt. Nun wird das spezifische Gewicht des Gemisches durch ein Aräometer bestimmt. Es dürfen nicht mehr als 1—2 Minuten verstreichen, bis der Tropfen zum Schwimmen gebracht, da er sonst allmählich durch Diffusionsvorgänge leichter wird (N. Zuntz).

2. Reaktion.

Das Blut reagiert gegen Lackmus und Lackmoid alkalisch, gegen Phenolphthalein neutral. Zum Nachweis zerreibt man das Blut

¹⁾ Zuntz und Frentzel, Die Elementaranalyse nach gasanalytischer Methode mit Hilfe der Berthelotschen Bombe. Chem. Berichte **30**, 380 (1897).

²⁾ Hammerschlag, Zeitschrift f. klin. Medizin **20**, 444 (1892). — Leo Zuntz, Pflügers Archiv **66**, 539 (1897).

mit überschüssigem, gepulvertem Ammoniumsulfat, hält ein rotes Lackmuspapier in den Brei und spritzt es mit Wasser ab, wobei ein blauer Fleck hinterbleibt.

Nach Loewy bestimmt man die Alkaleszenz am besten im lackfarbenen Blute, wobei die Menge Säure, die einer bestimmten Menge Blut hinzugefügt werden muß, um eine neutrale Reaktion gegen Lackmus oder Lackmoid zu erzielen, verschieden ist, je nachdem die Eiweißstoffe zuvor entfernt sind oder nicht; im letzteren Falle braucht man mehr Säure.

3. Bestimmung der Reaktion ohne Entfernung der Eiweißstoffe nach Loewy ¹⁾.

Man läßt das Blut direkt aus der Ader in einen 50 ccm fassenden, mit 45 ccm einer $\frac{1}{10}$ prozentigen Kaliumoxalatlösung beschickten Meßkolben, dessen enger Hals zwischen 49,5 und 50,5 ccm in $\frac{1}{10}$ ccm geteilt ist, bis zum kalibrierten Teil fließen und liest genau ab. Auf 9 Teile Salzlösung kommt ungefähr 1 Teil Blut. Die Flüssigkeit wird durchgeschüttelt, in ein Becherglas oder Erlenmeyerkolben gebracht und mit $n_{/25}$ Weinsäure titriert, bis ein Tropfen auf einem mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung getränkten Lackmus- oder Lackmoidpapierstreifen eine deutlich erkennbare Rotfärbung hervorruft. Als Lackmuspapier verwendet man ein sehr empfindliches, mit Lackmuskinktur gefärbtes, gelemtes Papier und läßt den Tropfen stets gleich lange einwirken, tupft ihn dann mit Filtrierpapier ab und beobachtet die Färbung im Augenblick des Abhebens des Filtrierpapiers.

4. Bestimmung der Reaktion nach Entfernung der Eiweißstoffe nach Hamburger ²⁾.

Das zu untersuchende Blut wird mit 96prozentigem Alkohol versetzt, vom Eiweiß abfiltriert, der Niederschlag in einem reinen Tuch ausgepreßt, in Alkohol suspendiert, wieder ausgepreßt; diese Manipulation wird noch drei- bis viermal wiederholt. Die vereinigten trüben Auszüge werden durch ein mit Alkohol befeuchtetes Filter filtriert, auf dem Wasserbade erwärmt, bis der Alkohol verdunstet ist; man füllt zum ursprünglichen Volumen mit Wasser auf und titriert mit $n_{/25}$ Weinsäure unter Benutzung von Lackmoidpapier als Indikator.

Verzögerung der Gerinnung. Die Gerinnung wird verzögert durch Abkühlen des Blutes, durch Zusatz von Säuren, Alkalien oder Ammoniak, durch Auffangen des Blutes in Öl oder in einem Gefäß, dessen Wandungen innen mit Vaseline überzogen sind.

Verhinderung der Gerinnung. Ganz aufgehoben wird die Gerinnung durch reichlichen Zusatz von konzentrierten Lösungen neutraler Salze der Alkalien und alkalischen Erden, von Alkalioxalaten oder Fluoriden, so z. B. 1 Volumen gesättigte Magnesiumsulfatlösung auf 3 Volumen Blut unter Zusatz von Wasser, Kaliumoxalatlösung so viel, daß das Blut 0,1 Proz. Oxalat

¹⁾ A. Loewy, Pflügers Archiv 58, 462 (1894).

²⁾ Hamburger, Du Bois Reymonds Archiv 1898, 1.

enthält. Ferner wird die Gerinnung durch Zusatz von Wasser, Hühnereiweiß, Zucker- oder Gummilösung, Glycerin usw. vollständig verhindert.

Beschleunigung der Gerinnung. Beschleunigt wird dagegen die Gerinnung des Blutes durch Erhöhung der Temperatur, durch Berührung mit fremden Körpern, an denen das Blut adhärirt, durch Umrühren oder Schlagen desselben, durch Luftzutritt, durch Zusatz von Platinrohr usw.

Defibriniertes Blut. Wird das Blut während der Gerinnung mit einem Stabe geschlagen, so scheidet sich das Fibrin als elastische Fasern oder faserige Massen ab.

Isolierung von Plasma. Schwer gerinnbares Blut, z. B. Pferdeblut, fängt man in hohen Zylindern auf und läßt bei 0° C stehen, wobei sich nach einiger Zeit die Blutkörperchen senken und die darüber stehende klare Flüssigkeit, das Plasma, sich abgießen läßt. Bei schneller gerinnendem Blut wird die Gerinnung durch Zusatz von Kaliumoxalat aufgehoben und in derselben Weise verfahren, oder man kann auch das Plasma durch länger dauerndes Zentrifugieren gewinnen.

Isolierung des Serums. Das Serum gewinnt man in der Weise, daß man das Blut gerinnen läßt und vom ausgeschiedenen Kuchen abgießt oder indem man defibriniertes Blut längere Zeit zentrifugiert.

Isolierung der Blutkörperchen. Zur Gewinnung der Blutkörperchen mischt man ungerinnbar gemachtes oder defibriniertes Blut mit dem zehnfachen Volumen einer Mischung von 1 Volumen gesättigter Kochsalzlösung und 9 Volumen Wasser und läßt in Schalen mit flachem Boden und senkrechten Wandungen absitzen oder zentrifugiert. Gießt man die überstehende Flüssigkeit vom schlammigen Bodensatz ab und vermischt diesen mit der Kochsalzlösung, so erhält man nach dem Absetzen reine, von den anderen Blutbestandteilen fast vollständig befreite Blutkörperchen.

Bestimmung des Blutkörperchenvolumens. Das relative Volumen der Blutkörperchen und des Serums im defibrinierten Blute kann man nach L. und M. Bleibtreu¹⁾ ermitteln, wenn man defibriniertes Blut in verschiedenen Verhältnissen mit einer isotonischen Kochsalzlösung vermischt (auf ein Volumen Blut höchstens 1 Volumen Kochsalzlösung), die Blutkörperchen sich zu Boden senken läßt oder durch Zentrifugieren abtrennt und die darüber stehende klare Mischung von Serum und Kochsalzlösung abhebt.

1. In wenigstens zwei solchen verschiedenen Mischungen von Serum und Kochsalzlösung bestimmt man nach Kjeldahl den Stickstoffgehalt, berechnet daraus durch Multiplikation mit 6,25 den entsprechenden Eiweißgehalt und findet dann das relative Volumen der Blutflüssigkeit x und damit auch das Volumen der körperlichen

Elemente $(1 - x)$ nach der Gleichung: $(e_1 - e_2) x = e_2 \frac{s_2}{b_2} - e_1 \frac{s_1}{b_1}$ in der für die Mischung 1 und 2 b_1 bzw. b_2 das zu der Mischung verwandte Blutvolumen, s_1 bzw. s_2 das Volumen der Kochsalzlösung und e_1 bzw. e_2 den Gehalt eines bestimmten Volumens jeder Mischung an Eiweiß bedeuten.

¹⁾ L. und M. Bleibtreu, Pflügers Archiv 51, 151, 55, 402, 60, 485.

2. Man bestimmt mittels des Pyknometers das spezifische Gewicht des Blutserums, der Kochsalzlösung und mindestens einer in der oben angegebenen Weise hergestellten Mischung von Serum und Kochsalzlösung. Man findet dann das relative Volumen des Serums x wie folgt: $x = \frac{s}{b} \cdot \frac{S - K}{S_0 - S}$, wo s und b die miteinander gemischten Volumina Kochsalzlösung und Blut, S das spezifische Gewicht der nach Absetzen der Blutkörperchen gewonnenen Serumkochsalzlösung, S_0 das spezifische Gewicht des Serums und K das der Kochsalzlösung bedeuten.

Das relative Volumen der körperlichen Elemente des Blutes wird nach Hedin ¹⁾ mittels der von Blix konstruierten „Hämatokrit“ genannten Zentrifuge in der Weise bestimmt, daß man eine abgemessene Menge Blut mit dem gleichen Volumen einer die Gerinnung verhindernden Flüssigkeit (1⁰/₀₀ Oxalat mit dem gleichen Volumen 9⁰/₀₀ Kochsalzlösung) mischt, mittels eines Kautschukschlauches in das Zentrifugenröhrchen aufsaugt und zusammen mit einem anderen, mit derselben oder einer anderen Blutmischung gefüllten Röhrchen zentrifugiert. Dann liest man die Höhe der Blutkörperchenschicht in dem in 100 Teile graduirten Röhrchen ab und berechnet daraus, durch Multiplikation mit 2, das Volumen, das die roten Blutkörperchen (Blutkörperchenschicht) des untersuchten Blutes einnehmen.

Bestimmung des Plasmas. Bei Bestimmungen des Verhältnisses zwischen Blutkörperchen und Blutflüssigkeit dem Gewichte nach geht man gewöhnlich von folgender Überlegung aus. Enthält das Blut irgendeine Substanz, die dem Plasma ausschließlich angehört und in den Blutkörperchen nicht vorkommt, so läßt sich der Gehalt des Blutes an Plasma berechnen, indem man die Menge dieser Substanz einerseits in 100 Teilen Plasma bzw. Serum, andererseits in 100 Teilen Blut bestimmt. Ist die Gewichtsmenge dieser Substanz in dem Plasma p und in dem Blute b , dann wird die Menge x des Plasmas in 100 Teilen Blut $x = \frac{100 \cdot b}{p}$ sein. Als solche Substanz, die in dem Plasma allein vorkommt, ist nach Hoppe-Seyler das Fibrin, nach Bunge ²⁾ das Natrium und nach Otto ³⁾ der Zucker zu verwenden.

Nach Hoppe-Seyler bestimmt man die Menge Serum und Plasma in der Weise, daß man einerseits Hämoglobin und Eiweiß in einer Blutprobe und andererseits die Menge Hämoglobin und Eiweiß in den Blutkörperchen einer anderen, gleich großen Probe desselben Blutes ermittelt, welche man durch wiederholtes Zentrifugieren nach Zusatz von einprozentiger Kochsalzlösung vollkommen von Serum rein gewaschen hat. Die Differenz zwischen beiden Werten gibt die Menge Eiweiß an, die in dem Serum der ersten Blutportion enthalten ist.

¹⁾ Hedin, Pflügers Archiv 60, 360 (1898).

²⁾ Bunge, Zeitschr. f. Biologie. Bd. 12, p. 191.

³⁾ Otto, Pflügers Archiv 35, p. 467.

Bestimmt man nun in einer besonderen Probe Serum desselben Blutes das Eiweiß, so läßt sich leicht die Menge des Serums in dem Blute bestimmen. Hat man die Menge der Blutkörperchen ermittelt und bestimmt man die Menge der verschiedenen Blutbestandteile in dem Serum einerseits und in dem Gesamtblute andererseits, so läßt sich auch die Verteilung dieser verschiedenen Blutbestandteile auf die Blutkörperchen und Blutplasma ermitteln.

5. Stroma.

Eigenschaften. Das frisch dargestellte Stroma löst sich in 0,2prozentiger Salzsäure und wird nach längerem Stehen unter Wasser nur noch teilweise löslich. Bei der Behandlung mit verdünnter Salzlösung geht ein globulinhaltiger Eiweißstoff in Lösung, mit Äther Cholesterin, mit Alkohol Phosphatide.

Darstellung. Die Stromata der Blutkörperchen werden in der Weise isoliert, daß man das Blut mit 10—20 Volumen 0,9prozentiger Kochsalzlösung verdünnt, das Gemenge zentrifugiert oder bei niedriger Temperatur stehen läßt und dieses Verfahren wiederholt, bis die Blutkörperchen vom Serum befreit worden sind. Die erhaltenen Blutkörperchen werden nun mit dem 5—6fachen Volumen Wasser versetzt und dann etwas Äther bis zur Lösung hinzugefügt, wobei sich beim Stehen die Leukozyten allmählich ausscheiden, die mittels der Zentrifuge entfernt werden. Die von ihnen getrennte Flüssigkeit wird mit einer 1prozentigen Kaliumbisulfatlösung versetzt, bis ihre Konsistenz so dick wird wie die des ursprünglichen Blutes. Die ausgeschiedenen Stromata werden auf dem Filter gewaschen (Wooldridge)¹⁾.

Nach dem Verfahren von Pascucci²⁾ versetzt man den aus defibriniertem Pferdeblut abgeschiedenen Blutkörperchenbrei mit dem 15—20 Volumen einer $\frac{1}{5}$ gesättigten Ammoniumsulfatlösung, läßt absetzen, dekantiert und zentrifugiert. Den Bodensatz läßt man in ganz dünner Schicht in flachen Porzellanschalen bei Zimmertemperatur eintrocknen, verreibt ihn mit Wasser und läßt bei 0° C stehen, wobei der Farbstoff in Lösung geht, während die Stromata zurückbleiben. Nach 24 Stunden gießt man die darüberstehende Flüssigkeit ab, wäscht den Bodensatz durch mehrmaliges Dekantieren, bringt ihn auf ein Filter und wäscht mit Wasser sorgfältig aus.

Lipoide. Zur Isolierung der Lipoide extrahiert man die getrockneten Stromata im Soxhletapparat bis zur Erschöpfung mit Äther, wobei Neutralfett, Fettsäuren, Cholesterin, Phosphatide (Lezithin, Kephalin), Lipochrome, aromatische und andere sonst ätherunlösliche Stoffe in die ätherische Lösung übergehen. Bei der fortgesetzten Extraktion mit Alkohol bis zur Erschöpfung erhält man Phosphatide, Sphingomyelin, Aminomyelin und Cerebroside, während der Rest der Lipoide durch weitere Extraktion mit Chloroform gewonnen wird. (Nicht veröffentlichte Untersuchung des Verfassers.)

¹⁾ Wooldridge, Archiv f. (Anatom. und) Physiol. 1881, 387.

²⁾ Pascucci, Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie 6, 543 (1905).

6. Kernhaltige rote Blutkörperchen.

Die kernhaltigen roten Blutkörperchen der Vögel, Amphibien, Fische enthalten außer den Bestandteilen der kernlosen Erythrozyten noch die Bestandteile des Kernes (Histone, Nukleinsäure).

Darstellung. Man löst unter Umrühren die mehrmals mit Kochsalzlösung ausgewaschenen Blutkörperchen im Scheidetrichter in Wasser von 40° C, fügt $\frac{1}{4}$ Volumen 3,6prozentige Kochsalzlösung hinzu, zentrifugiert, suspendiert die abgesetzte Masse im Scheidetrichter in 46° C warmem Wasser, fügt genau soviel Kochsalzlösung hinzu und zentrifugiert. Diese Manipulation wiederholt man so lange, bis die Masse farblos, ohne rote Streifen wird und keinen Farbstoff mehr abgibt. Nun läßt man die Masse in Wasser aufquellen, versetzt mit dem doppelten Volumen Alkohol, zentrifugiert, wäscht mit Alkohol aus, verreibt noch einmal mit 96prozentigem Alkohol, dann mit absolutem Alkohol und Äther. Das Verfahren darf bis zum Einbringen in Alkohol nicht mehr als 3 Tage dauern. Die Kernmasse soll über Nacht nicht in Wasser, sondern in der Kochsalzlösung an einem kühlen Orte aufbewahrt werden (Ackermann)¹⁾.

Bang²⁾ empfiehlt, die ausgewaschenen Blutkörperchen in einer sehr verdünnten Natronlauge (weniger als 0,1¹⁰/₀₀ NaOH) zu lösen und die Kernbestandteile mit Chlorkalzium als voluminösen Niederschlag auszufällen.

Nukleohiston. Diesen charakteristischen Kernbestandteil erhält man aus dem Niederschlag durch Ausziehen mit 5prozentiger Kochsalzlösung und Verdünnung des Filtrates mit mehreren Volumen Wasser. Es löst sich leicht in Wasser und fällt auf Zusatz von sehr geringen Salzmenen; bei einem größeren Zusatz von Neutralsalz (1,7—2,2 Proz. NaCl) wird die Lösung wieder vollständig klar. Bei der Extraktion mit verdünnter Salzsäure spaltet es sich in Histonchlorid, das in Lösung geht, und Nukleinsäure, die mit einer geringen Menge einer eiweißartigen Substanz zurückbleibt. Der durch zweiwertige Metallsalze hervorgerufene Niederschlag löst sich in 2—5prozentiger Kochsalzlösung.

Histon. Kossel³⁾ erhielt das Histon der Vogelblutkörperchen durch Extraktion der Kernmasse mit verdünnter Salzsäure, wobei das Histon in Lösung geht, aus der es auf Zusatz von Ammoniak ausfällt. Seine Zusammensetzung ist C 52,31 Proz., H 7,09 Proz., N 18,46 Proz. In einem großen Überschuß von Ammoniak ist das Histon wieder löslich; in derselben Weise verhält es sich den Alkalien und Erdalkalien gegenüber. Der durch Salpetersäure entstehende Niederschlag löst sich beim Erwärmen und scheidet sich beim Erkalten wieder

¹⁾ Ackermann, Zur Chemie der Vogelblutkerne. Zeitschr. f. physiol. Chemie **43**, 299 (1904—1905).

²⁾ J. Bang, Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie **5**, 317 (1904).

³⁾ A. Kossel, Über einen peptonartigen Bestandteil des Zellkerns (aus Gänseblutkörperchen) **8**, 511 (1884).

aus. Das Histon scheidet sich beim Kochen aus, die Fällung löst sich in Säure. Es wird ferner durch phosphorwolframsaures Natron, pikrinsaures Natron, Ferrozyankalium, sowie Eiweißlösungen gefällt (Bang)¹⁾.

7. Histopecton.

Nach Kossel²⁾ stellt man das Histopecton aus Vogelblutkörperchen dar, indem man das Histon etwa 10 Tage mit Pepsinsalzsäure bis zum Verschwinden der Biuretreaktion digeriert, filtriert und das Filtrat mit Natriumpikrat fällt. Den Niederschlag wäscht man mit Natriumpikratlösung aus, fügt Schwefelsäure hinzu und entfernt die Pikrinsäure durch Ausschütteln mit Äther. Nun wird aus der schwefelsauren Lösung das Histopecton durch Zusatz von Alkohol als Sulfat gefällt.

8. Globin.

Eigenschaften. Das Globin scheidet sich in Form von schwach gelbgefärbten Flocken aus von der Zusammensetzung C 54,97 Proz., H 7,20 Proz., N 16,89 Proz., S 0,42 Proz. Die salzfreie neutrale Lösung gibt mit Ammoniak einen im Überschuß desselben löslichen Niederschlag, wird durch geringe Mengen von Ammoniumsulfat, Kochsalz und Alkohol gefällt. Biuretreaktion, Xanthoproteinprobe, Millons und Adamkiewiczs Probe schwach, Molischs negativ. Eine 0,98 prozentige, schwach saure, wässrig-alkoholische Lösung zeigt $[\alpha]_D = -65,5^\circ$ C.

Darstellung. Man versetzt eine salzfreie Hämoglobininlösung mit einer sehr geringen Menge stark verdünnter Salzsäure, bis eine flockige braune Fällung entsteht, die sich beim Zusatz eines geringen Überschusses von Säure sofort leicht löst. Es entsteht dabei eine braune Flüssigkeit, die bei eben saurer Reaktion auf Zusatz von etwa $\frac{1}{5}$ Volumen Alkohol und nach Ausschütteln mit Äther sich in zwei Schichten teilt — der ganze Farbstoff tritt in die Ätherschicht über und die untenstehende, wässrig-alkoholische klare Lösung enthält den entfärbten Eiweißkörper. (Beim Ausschütteln mit Äther muß ein bestimmtes Verhältnis zwischen Wasser, Alkohol und Äther bestehen, das am besten in jedem Versuche ausprobiert wird.) Die so erhaltene wässrig-alkoholische Lösung scheidet beim Neutralisieren mit Ammoniak einen schwach gelbgefärbten, grobflockigen Niederschlag aus, der sofort abgesaugt, in Wasser durch Zusatz einiger Tropfen Essigsäure gelöst wird. Durch mehrtägiges Dialysieren wird die Essigsäure entfernt. Man erhält so eine völlig neutrale, absolut klare, schwach gefärbte Globininlösung (Schulz)³⁾.

9. Blutplättchen.

Zur Isolierung der Blutplättchen zentrifugiert man bei einer Umdrehungszahl von etwa 1600 in der Minute 1—1½ Stunden das

¹⁾ J. Bang, Studien über das Histon. Zeitschr. f. physiol. Chemie **27**, 463 (1899).

²⁾ A. Kossel und H. Pringle, Über Protamine und Histone. Zeitschr. f. physiol. Chemie **49**, 301 (1906).

³⁾ Fr. Schulz, Der Eiweißkörper des Hämoglobins. Zeitschr. f. physiol. Chemie **23**, 399 (1897).

in Fluornatriumlösung aufgefangene Blut, wobei sich die roten Blutkörperchen zu Boden setzen, während über ihnen sich eine weiße Schicht aus Leukozyten und Blutplättchen ausscheidet. Das darüberstehende, weißlich getrübte, zuweilen auch klare Plasma hebert man ab und zentrifugiert nochmals 3—4 Stunden bei einer Umdrehungszahl von 2000 in der Minute. Die am Boden festhaftenden Plättchen werden durch Kochsalz vom Plasma befreit (Morawitz)¹⁾.

F. Blutplasma und Blutserum.

1. Fibrinogen.

Eigenschaften. Das Fibrinogen hat die allgemeinen Eigenschaften der Globuline, unterscheidet sich aber von den andern dadurch, daß es weiß zu einer zähen, elastischen Masse oder Klümpchen leicht sich zusammenballende, in verdünnter Kochsalzlösung lösliche Flöckchen darstellt. Die Fibrinlösungen werden von einem Überschuß von Kochsalz in Substanz vollständig gefällt. Die Lösung in Kochsalz von 5—10 Proz. koaguliert bei 52—55°. Fibrinogen des Pferdeblutes hat die spezifische Drehung $[\alpha]_D = -52,5^\circ$ (Mittelbach). Die elementare Zusammensetzung ist nach Hammarsten C 52,93 Proz., H 6,9 Proz., N 16,66 Proz., S 1,25 Proz., O 22,26 Proz.

Nachweis. Fibrinogen ist überall da vorhanden, wo Spontangerinnungen von tierischen Gewebsflüssigkeiten stattfinden oder wo solche Gerinnungen durch Zusatz von Fibrinferment oder von frischem Blutserum oder anderer fermenthaltiger Flüssigkeit hervorgerufen werden. Zu diesem Zwecke überläßt man eine Portion der zu prüfenden Flüssigkeit der Spontangerinnung, eine andere Portion versetzt man mit ein wenig vom Fibrin durch Schlagen befreitem und filtriertem Blutserum und läßt bei 35° C 12 Stunden stehen.

Ferner dient zum Nachweis der Koagulationstemperatur: Tritt in der zu prüfenden Lösung bei 52—55° C Trübung ein, so ist Fibrinogen vorhanden.

Fibrinogen ist linksdrehend. Die spezifische Drehung des Pferdeblutfibrinogens ist $[\alpha]_D = -52,5^\circ$ (Mittelbach)²⁾.

Darstellung. Zur Darstellung des Fibrinogens wird Salzplasma oder Oxalatplasma mit dem gleichen Volumen gesättigter Kochsalzlösung gefällt, der Niederschlag ausgepreßt, in 8prozentiger Kochsalzlösung gelöst, filtriert, das Filtrat nochmals, wie oben, mit Kochsalz gefällt, die Fällung dreimal wiederholt, der zuletzt erhaltene Niederschlag zwischen Filtrierpapier ausgepreßt und in Wasser suspendiert, wobei sich das Fibrinogen in Gegenwart des im Niederschlag noch vorhandenen Kochsalzes löst und durch Dialyse gegen schwach alkalisches Wasser salzfrei erhalten wird. Das Fibrinogen kann aus der Lösung durch Alkohol abgeschieden werden (Hammarsten)³⁾.

Da die so erhaltene Fibrinogenlösung noch Fibringlobulin enthält, empfiehlt Huiskamp⁴⁾, die Lösung mit 2 Volumen gesättigter Fluornatriumlösung zu versetzen, wodurch das Fibrinogen niedergeschlagen wird, während das Fibringlobulin in Lösung bleibt. Man löst das Fibri-

¹⁾ Morawitz, Deutsches Archiv f. klinische Medizin **79**, 224 (1904).

²⁾ Mittelbach, Zeitschr. f. physiol. Chemie **19**, 289 (1894).

³⁾ Hammarsten, Über die Bedeutung der löslichen Kalksalze für die Faserstoffgerinnung. Zeitschr. f. physiol. Chemie **22**, 333 (1896).

⁴⁾ W. Huiskamp, Zur Fibringlobinfrage. Zeitschr. f. physiol. Chemie **44**, 182 (1902); **46**, 273 (1905).

nogen in 0,05prozentigem Ammoniak, neutralisiert mit verdünnter Kochsalzlösung und wiederholt die Fällung.

Das Verfahren von Huiskamp¹⁾ besteht darin, daß man das zu untersuchende Blut in einprozentigem Kaliumoxalat auffängt, nach etwa $\frac{1}{2}$ Stunde zentrifugiert, das noch nicht klare Plasma abhebt und nach 2—2 $\frac{1}{2}$ Stunden wieder zentrifugiert. Hierauf versetzt man das klare Plasma mit dem gleichen Volumen gesättigter, kalkfreier Kochsalzlösung, zentrifugiert den entstandenen gallertigen Niederschlag etwa 15 Minuten, bis er sich zusammenballt, nimmt ihn mit einem Glasstab heraus und preßt zwischen Filtrierpapier ab. Nun löst man den Niederschlag in Wasser, fällt die Lösung durch Halbsättigung mit Kochsalz, wobei sich der Niederschlag sofort am Boden absetzt. Dieser wird dann am Boden des Gefäßes zusammengepreßt, herausgenommen und nochmals in Wasser gelöst. Nach Wiederholung dieser Manipulation erhält man eine bläuliche, opalisierende Lösung von reinem Fibrinogen.

Quantitative Bestimmung. Das Fibrinogen läßt sich in der Weise bestimmen, daß man die aus dem Fibrinogen durch Fibrinferment gebildete Fibrinmenge wägt und diesen Wert als Näherungswert der vorhandenen Fibrinogenmenge gleichsetzt. Als Fibrinferment benutzt man frisches, durch Schlagen vom Fibrin befreites, filtriertes und bis zur Klärung zentrifugiertes Blutserum, das man in einem Becherglas mit der gleichen Menge der zu untersuchenden Flüssigkeit (50—100 ccm) versetzt und 24 Stunden bei 20—30° C stehen läßt. Durch Schlagen mit einem Glas- oder Holzstab bringt man das Fibrin zum Zusammenballen, wäscht auf einem gewogenen Filter mit 1prozentiger Kochsalzlösung, heißem Alkohol und Äther und trocknet bei 110° C bis zur Gewichtskonstanz.

Reye bestimmt das Fibrinogen, indem er durch Zusatz von 0,56—0,6prozentiger Natriumfluoridlösung ungerinnbar gemachtes Blut durch Zentrifugieren von den Blutkörperchen befreit, 12 Teile des so erhaltenen Plasma mit 30 Teilen Wasser verdünnt und mit 16 Teilen einer neutralen gesättigten Ammoniumsulfatlösung versetzt, wobei sich bald ein Niederschlag ausscheidet. Dieser wird abfiltriert, in 5prozentiger Kochsalzlösung gelöst, mit Ammoniumsulfat in derselben Weise gelöst, mit einer verdünnten Ammoniumsulfatlösung bis zum Verschwinden der Biuretreaktion gewaschen. Der schneeweiße, flockige Niederschlag wird an der Luft getrocknet, bei 80° C koaguliert, mit heißem Wasser salzfrei gewaschen und bei 110° C bis Gewichtskonstanz getrocknet.

2. Fibrin.

Eigenschaften. Der typische, faserige und elastische, nach dem Auswaschen weiße Faserstoff steht in seinen Löslichkeitsverhältnissen den koagulierten Eiweißkörpern sehr nahe, unterscheidet sich aber von ihnen durch seine relativ leichte Veränderlichkeit durch Salzlösungen. In Wasser, Alkohol und

¹⁾ W. Huiskamp, Zur Fibringlobinfrage. Zeitschr. f. physiol. Chemie 44, 182 (1902); 46, 273 (1905).

Äther ist er unlöslich. Die Eigenschaften der Elastizität und des physikalischen Verhaltens sind von seiner Dichte außerordentlich abhängig. Durch Salz- oder Alkoholbehandlung geht die Elastizität unter gleichzeitiger Schrumpfung verloren, im Kontakt mit Wasser kehrt sie teilweise unter Quellung wieder. In Salzsäure, wie auch in Kali- oder Natronlauge quillt Fibrin zu einer gallertähnlichen Masse auf, die bei Zimmertemperatur erst nach mehreren Tagen, bei Körpertemperatur etwas schneller sich löst. Die elementare Zusammensetzung ist nach Hammarsten C 52,68 Proz., H 6,83 Proz., N 16,91 Proz., S 1,10 Proz.

Nachweis. Zum Nachweis des Fibrins werden die in Gewebsflüssigkeiten vorkommenden, durch Aufschlemmen in Wasser und Waschen mit 5—10prozentigen thymolhaltiger Kochsalzlösung gereinigten Niederschläge auf das Verhalten gegen 0,1prozentige Salzsäure (Aufquellung!) oder Pepsinsalzsäure resp. Magensaft (leichte Verdaulichkeit!) geprüft.

Darstellung. Das Fibrin entsteht aus Fibrinogen bei der Gerinnung des aus der Ader gelassenen Blutes, bei der Gerinnung von Lymphe, Transsudaten, von reiner Fibrinogenlösung nach Zusatz von Fibrinferment als Gallerte, die sich allmählich zusammenzieht und beim Schlagen faserig und elastisch wie Kautschuk wird.

Da durch Schlagen des Blutes gewonnenes Fibrin stets von eingeschlossenen entfärbten roten Blutkörperchen oder Resten davon und von lymphoiden Zellen verunreinigt ist, so empfiehlt es sich, zur Reindarstellung nur filtrierte Plasma oder filtrierte Transsudate anzuwenden. Die spontan gerinnenden Flüssigkeiten werden direkt, die nicht spontan gerinnenden erst nach Zusatz von Blutserum oder Fibrinfermentlösung mit einem Fischbeinstabe oder rauhem Holzstabe energisch geschlagen, die ausgeschiedenen Gerinnsel, die sich um den Stab aufgewickelt haben, entfernt und unter Umrühren und Kneten mit großen Mengen Wasser, dann mit einer 5prozentigen Kochsalzlösung, darauf wieder mit Wasser und mit 0,02prozentigem Ammoniak gewaschen und zuletzt mit Alkohol und Äther extrahiert.

Heubner¹⁾ fängt das Pferdeblut in soviel Kochsalzlösung auf, daß eine Lösung von 60 Proz. Blutplasma und 4 Proz. Kochsalz entsteht, und entfernt die Blutkörperchen durch Zentrifugieren. Um ein Gerinnungsoptimum herzustellen, verdünnt er mit der entsprechenden Menge Wasser, versetzt dann die Lösung mit Ammoniak bis 0,0014 Proz. und rührt die Flüssigkeit während 48 Stunden mit dem mechanischen Rührwerk, wobei sich das entstehende Gerinnsel um den Rührer wickelt. Das von dem Rührer entfernte Gerinnsel wird zerschnitten, mit 10prozentiger Kochsalzlösung bis zum Verschwinden der Biuretreaktion, dann mit Wasser salzfrei gewaschen und bei 110° C getrocknet.

Quantitative Bestimmung. In ein 100 ccm fassendes, mit einem ruderförmigen Fischbeinstäbchen und einer abschließenden Gummikappe versehenes Becherglas, das man trocken gewogen hat, fängt man direkt aus dem Blutgefäß 10—40 ccm Blut auf oder man bringt eine gemessene Menge des auf Eis aufbewahrten Plasmas hinein. Man verschließt das Becherglas mit der Kautschukkappe, schlägt das Blut oder Plasma vorsichtig mit dem Fischbeinstäbchen, ohne den

¹⁾ W. Heubner, Die Spaltung des Fibrinogens bei der Fibringerinnung. Archiv f. exper. Pharmakologie und Pathologie 49, 229 (1903).

Verschluß zu lockern, etwa 10 Minuten und wägt das Ganze. Hierauf öffnet man und füllt das Glas fast vollständig mit Wasser, rührt gut um und läßt stehen, bis sich die Fibrinflocken ausgeschieden haben. Dann gießt man das überstehende Wasser vorsichtig ab, ersetzt es durch kochsalzhaltiges, rührt um und läßt wieder stehen. Nach dem Absetzen gießt man die Flüssigkeit wieder ab und wiederholt das Auswaschen solange, bis das Fibrin hell und die darüberstehende Flüssigkeit farblos geworden ist. Nun bringt man das Fibrin quantitativ auf ein getrocknetes und gewogenes Filter, wäscht mit Wasser, dann mit kochendem Alkohol und mit Äther nach, trocknet bei 110–120° C, läßt im Vakuum erkalten und wägt.

3. Nukleoproteid.

Eigenschaften. Das von Pekelharing im Rinderblutserum entdeckte Nukleoproteid ist in Wasser und Salzlösungen unlöslich, in Soda- und verdünnten Alkalilösungen löslich, verliert aber diese Löslichkeit durch Behandlung mit Alkohol, ferner ist es in Essigsäure sehr schwer löslich, was zur Trennung des Proteids von den Globulinen gedient hat. Durch Sättigung mit Magnesiumsulfat und Halbsättigung mit Ammoniumsulfat, ferner durch Kalzium- und Bariumchlorid wird es gefällt. Die meisten Eiweißreaktionen, mit Ausnahme der von Adamkiewicz-Hopkins, fallen positiv aus. Es gerinnt bei 65–69° C, die elementare Zusammensetzung ist C 51,85 Proz., H 7,24 Proz., N 14,03 Proz., P 0,08 Proz.

Darstellung. Man verdünnt einen Teil Rinderblutserum mit 2 Teilen Wasser und versetzt mit verdünnter Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaktion, wobei ein aus Globulin und Nukleoproteid bestehender flockiger Niederschlag ausfällt. Nach dem Absetzen wird er auf ein Filter gebracht, in ammoniakhaltigem Wasser gelöst und die Lösung mit Kalziumchlorid gefällt. Die Lösung und Fällung wird noch einmal wiederholt, der nun entstehende Niederschlag auf dem Filter mit Alkohol so lange, bis der Waschalkohol vollständig kalkfrei ist, dann mit Äther gewaschen; man läßt ihn schließlich lufttrocken werden (Pekelharing, Huiskamp)¹⁾.

Das zu verwendende Pferdeblutserum wird mit der 20fachen Menge Wasser verdünnt, die dabei entstehende Trübung setzt sich bald zu Boden, Euglobulin und das Nukleoproteid scheiden sich aus. Die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit wird dekantiert oder abgehebert, der noch feuchte Niederschlag in flachen Gläsern zentrifugiert, mit der fünffachen Menge einer 1prozentigen Kochsalzlösung überschichtet und stehen gelassen. Nach sechsständigem Stehen gießt man die das Globulin enthaltende Lösung von dem glasigen schleimigen, fadenziehenden Bodensatz ab, löst diesen in 1prozentiger Kochsalzlösung unter Zusatz von etwas Natriumkarbonat und versetzt mit verdünnter Essigsäure, wobei nach einigem Stehen ein flockiger Niederschlag ausfällt. Der Niederschlag wird auf ein Filter gebracht, durch Übergießen mit absolutem Alkohol koaguliert, mit heißem Wasser

¹⁾ Pekelharing, Untersuchungen über das Fibrinferment. Verhändl. der kon. Akad. d. Wetens. Amsterdam 1892 und 1895. — Huiskamp, Über das Nukleoproteid der Thymusdrüse. Zeitschr. f. physiol. Chemie 32, 191 (1901).

gewaschen, getrocknet und im Soxhletapparat mit Alkohol und dann mit Äther bis zur vollständigen Erschöpfung extrahiert, wodurch Cholesterin und Fett entfernt werden; hierauf extrahiert man noch etwa 10 Stunden mit Chloroform (Liebermeister)¹⁾.

Das Nukleoproteid im Blutplasmaniederschlag von Bang²⁾,

Das mit 0,3 Ammoniumoxalatlösung versetzte Pferdeblut wird zentrifugiert, das Plasma abgetrennt, filtriert und 48 Stunden im Eisschrank stehen gelassen, wobei sich ein Niederschlag bildet; derselbe wird durch Zentrifugieren gesammelt, in Wasser gelöst, vom ungelösten Anteil abfiltriert und das Filtrat mit Kalziumchlorid versetzt. Der dabei entstehende Niederschlag wird abzentrifugiert, in 0,01prozentiger Natronlauge gelöst. Die schleimige Lösung scheidet nach einigem Stehen einen aus zusammengeballten Schleimflocken bestehenden Niederschlag aus, den man mittels eines Glasstabes entfernt und in 0,05prozentiger Salzsäure löst, wobei ein Teil durch Spaltung des ursprünglichen Nukleoproteids als ein lösliches Albuminat in Lösung geht.

Serummukoid von Zanetti³⁾.

Man versetzt 1200 ccm Rinderblutserum mit 2 Volumen einer 1,5prozentigen Kochsalzlösung und erhitzt unter Zusatz von verdünnter Essigsäure, bis das Albumin und Globulin auskoagulieren. Das im Vakuum bei 45° C bis auf ein kleines Volumen eingedampfte klare Filtrat wird mit Alkohol gefällt, der Niederschlag auf dem Filter mit Alkohol und Äther ausgewaschen, bis er farblos ist, dann in Wasser gelöst und die Lösung gegen laufendes und gegen destilliertes Wasser dialysiert. Das auf ein kleines Volumen eingedampfte Dialysat wird mit Alkohol gefällt, Lösung und Fällung drei- bis viermal wiederholt und der nun abfiltrierte Niederschlag im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

4. Fibrinoglobulin.

Eigenschaften. Es hat die allgemeinen Eigenschaften der Globuline, unterscheidet sich aber von den Serumglobulinen durch eine niedrigere Gerinnungstemperatur, 64—66° C, sowie dadurch, daß es schon bei 28prozentiger Sättigung mit Ammoniumsulfatlösung gefällt wird. Die Elementaranalyse gab: C 52,70 Proz., H 6,98 Proz., N 16,06 Proz.

Nachweis. Zum Nachweis dienen die Darstellung und die Eigenschaften, hauptsächlich die Koagulationstemperatur. Da aber Fibrinoglobulin stets neben Fibrinogen vorkommt, so weist man zuerst die Anwesenheit des letzteren durch einen Fermentversuch mit reinem Fibrinferment nach.

Darstellung. Nach Hammarsten⁴⁾ löst man das gemeine

¹⁾ G. Liebermeister, Über das Nukleoproteid des Blutserums. Hofmeisters Beiträge 8, 439 (1906).

²⁾ J. Bang, Chemische Untersuchungen der lymphatischen Organe. Hofmeisters Beiträge 4, 362 (1904).

³⁾ C. M. Zanetti, Über das Ovomukoid und über ein neues Glykoproteid des Blutserums. Annal di Chimia e di Farmaz. 26, 12 (1897).

⁴⁾ O. Hammarsten, Weitere Beiträge zur Kenntnis der Fibrinbildung. Zeitschr. f. physiol. Chemie 28, 98 (1899). Über die Bedeutung der löslichen Kalksalze für die Faserstoffgerinnung 22, 333 (1896). Malays Jahresbericht 1882, 11.

Fibrinogen in verdünnter Kochsalzlösung und fällt es durch Zusatz von Ferment oder fermenthaltiger Lösung als Fibrin oder auch durch Erwärmen auf 56° C aus. Im Filtrate befindet sich das Fibringlobulin, das man entweder durch Erhitzen der Lösung auf 64° C in denaturierter oder durch Sättigen der Lösung mit Kochsalz in genuiner Form abscheidet. Die Fällung wird nun in verdünnter Kochsalzlösung gelöst, mit viel Wasser versetzt, der ausgefallene Niederschlag dialysiert, das Dialysat mit Alkohol gefällt und der Niederschlag mit Äther gewaschen. Die Darstellung aus Blutserum geschieht in derselben Weise.

5. Serumglobuline.

Eigenschaften. Im feuchten Zustande stellen sie eine schneeweiße, feinflockige, aber nicht zähe oder elastische Masse dar, die regelmäßig Thrombin (Fibrinferment) enthält und infolgedessen eine Fibrinogenlösung zum Gerinnen bringt. Die neutral reagierenden Lösungen werden durch Sättigen mit Natriumchlorid nur unvollständig und von dem gleichen Volumen gesättigter Kochsalzlösung gar nicht gefällt, ebenso werden sie durch Dialyse oder durch Säurezusatz nur teilweise gefällt. Durch Sättigung mit Magnesiumsulfat oder Halbsättigung mit Ammoniumsulfat kann man dagegen eine vollständige Ausfällung bewirken. Die Gerinnungstemperatur ist bei einem Gehalte der Lösung an 5—10 Proz. Kochsalz 69—76° C, sonst aber etwa 75° C. Die spezifische Drehung in salzhaltiger Lösung ist für Serumglobulin aus Rinderblut nach Frederiq $[\alpha]_D = -47,8^\circ$. Die Gerinnungstemperatur, spezifische Drehung, Brechungskoeffizient und elementare Zusammensetzung der verschiedenen Globulinfraktionen unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander. Die mittlere Zusammensetzung ist nach Hammarsten C 52,71 Proz., H 7,01 Proz., N 15,85 Proz., S 1,11 Proz.

6. Darstellung des Serumglobulins durch Verdünnen oder Ansäuern.

Zur Darstellung des Serumglobulins kann man nach Hammarsten¹⁾ das frische, zellfreie Rinderblutserum mit der 10—20fachen Menge Wasser verdünnen, worauf ein Niederschlag von Globulin entsteht. Leitet man nun etwa 2 Stunden lang Kohlensäure ein, so vermehrt sich der Niederschlag; statt der Kohlensäure kann man auch schon vor dem Verdünnen mit verdünnter Essigsäure oder Salzsäure schwach ansäuern. Nach 24 Stunden filtriert man vom Niederschlag ab, wäscht mit Wasser nach, löst ihn in verdünnter Kochsalzlösung oder in Wasser mit Hilfe von möglichst wenig Alkali und fällt dann wieder durch Verdünnen mit Wasser bzw. durch Zusatz von wenig Essigsäure. Der Niederschlag wird salzfrei gewaschen, mit Alkohol und Äther behandelt und getrocknet. Auf diese Weise wird aber nicht alles Serumglobulin erhalten.

7. Darstellung und Bestimmung des Serumglobulins nach Hammarsten²⁾.

Das neutrale Blutserum wird bei 30° C unter Umrühren mit festem, fein gepulvertem Magnesiumsulfat bis zur Sättigung versetzt,

¹⁾ O. Hammarsten, Über das Paraglobulin. Pflügers Archiv **17**, 413 18, 38 (1878). Über das Fibrinogen. Ebenda **22**, 431 (1880).

²⁾ O. Hammarsten, Über die Anwendung des Magnesiumsulfats zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Serumalbumin und Serumglobulin. Zeitschr. f. physiol. Chemie **8**, 467 (1897).

wobei eine voluminöse Fällung entsteht, die man nach einigem Stehen abfiltrieren kann. Die Fällung wird auf dem Filter mit gesättigter, neutraler Magnesiumsulfatlösung gewaschen, in Wasser gelöst und die Lösung mit Magnesiumsulfat in derselben Weise wieder gefällt. Der Niederschlag wird nun wieder in Wasser gelöst, durch Dialyse salzfrei gefällt, auf ein getrocknetes und gewogenes Filter gebracht, mit kochendem Wasser bis zur vollständigen Entfernung der Salze ausgewaschen, mit Alkohol behandelt, getrocknet, gewogen und zur Bestimmung der Asche verbrannt. Nach Kauder¹⁾ und Pohl²⁾.

Man versetzt das schwach alkalische Blutserum mit dem gleichen Volumen einer neutralen, gesättigten Ammoniumsulfatlösung, wodurch ein Niederschlag entsteht, der auf dem Filter mit halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen wird. Hierauf löst man den Niederschlag in Wasser oder verdünnter Kochsalzlösung, fällt mit halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung, wiederholt diese Manipulation zum drittenmal, wäscht den zuletzt erhaltenen Niederschlag mit halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung bis zum Verschwinden der Biurettreaktion, preßt ihn gut ab und dialysiert 24 Stunden lang. Das durch ausgeschiedenes Globulin getrübe Dialysat wird mit einem Überschuß an Alkohol versetzt, filtriert, das Filter öfter mit Alkohol gefüllt, der Niederschlag dann mit Äther nachgewaschen, getrocknet und gewogen.

8. Darstellung von fibrinogenfreiem Serumglobulin nach Reye³⁾.

Man verdünnt 2 Teile Blutserum mit 5 Teilen Wasser und versetzt mit 3 Teilen gesättigter Ammoniumsulfatlösung, die das Fibrinogen und Fibringlobulin neben etwas Globulin fällt. Das Filtrat versetzt man mit soviel Ammoniumsulfatlösung, daß eine halbgesättigte Lösung entsteht, wobei das Serumglobulin ausfällt, das man in der oben gegebenen Weise reinigt und auch quantitativ bestimmt.

9. Fraktionierte Trennung der Serumglobuline.

1. Trennung in wasserlösliches und wasserunlösliches Globulin. Wird das durch Sättigung mit Magnesiumsulfat ausgeschiedene Globulin der Dialyse unterworfen, so scheidet sich nur ein Teil des Globulins aus, während der Rest in Lösung bleibt und auch durch Säurezusatz nicht gefällt wird. Aus diesem Grunde hat Marcus⁴⁾ auch die Teilung der Globuline in wasserlösliche und in wasserunlösliche vorgeschlagen.

¹⁾ G. Kauder, Zur Kenntnis der Eiweißkörper des Blutserums. Archiv f. experim. Pharm. 20, 411 (1886).

²⁾ J. Pohl, Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Globulins im Harn und in serösen Flüssigkeiten. Archiv f. experim. Pharm. 20 (1886).

³⁾ W. Reye, Über Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens. Dissertation Straßburg 1898.

⁴⁾ E. Marcus, Über ein wasserlösliches Serumglobulin. Zeitschr. f. physiol. Chemie 28, 559 (1899).

2. Trennung durch fraktionierte Salzfällung in Euglobulin und Pseudoglobulin. Die späteren Untersuchungen von Hofmeister und Pick¹⁾ haben ergeben, daß der wasserunlösliche Teil in der Hauptsache einer durch Ammoniumsulfat leichter — 28—36 Volumproz. gesättigte Lösung — und der wasserlösliche einer schwerer — durch 36—44 Volumproz. gesättigter Lösung — fällbaren Globulinfraktion entsprechen. Die erste Fraktion wird Euglobulin, die zweite Pseudoglobulin genannt. Fuld und Spiro²⁾ erhalten diese Fraktionen, indem sie das Blutserum zuerst auf eine Sättigung von 24 Proz. Ammoniumsulfat bringen, wobei sich das Fibringlobulin abscheidet, dann das Filtrat auf eine Sättigung von 33 Proz. Ammoniumsulfat, wobei das Euglobulin ausfällt. Bringt man nun das Filtrat vom Euglobulin auf den Sättigungsgrad von 34 Proz. bis auf 46 Proz. steigend, so scheidet sich das Pseudoglobulin aus. Nach Porges und Spiro³⁾ lassen sich indessen die Serumglobuline mit Ammoniumsulfat in drei Fraktionen zerlegen, deren Fällungsgrenzen 28—36 Proz., 33—42 Proz. und 40,46 Proz. salzgesättigter Lösung sind. Auffallenderweise enthalten alle drei Fraktionen wasserunlösliches Globulin.

3. Trennung durch Salzfällung und Dialyse. Freund und Joachim⁴⁾ lösen den Euglobulin- und Pseudoglobulinniederschlag in so viel Wasser, daß die Lösung dieselbe Konzentration hat wie die Ausgangslösung, fällen mit Ammoniumsulfat und wiederholen diese Manipulation zwei- bis dreimal, wobei die Pseudoglobulinlösung durch $\frac{1}{3}$ Ammoniumsulfatsättigung auf Euglobulin geprüft und eventuell filtriert wird. Beide Lösungen dialysiert man gegen strömendes Wasser 4—6 Wochen lang, wobei sich in beiden Lösungen unlösliches Globulin ausscheidet, das abfiltriert, mit Wasser bis zum Verschwinden der Biuretreaktion gewaschen, dann so lange mit 0,6prozentiger Kochsalzlösung extrahiert wird, als noch Eiweiß in Lösung geht. Bei dem unlöslichen Globulin beider Lösungen bleibt ein Teil in Kochsalz ungelöst, löst sich aber in 0,25prozentiger Sodalösung.

Hieraus folgt, daß die Zahl der verschiedenen Globuline im Serum eine noch größere sein dürfte, daß entweder der Unterschied zwischen wasserlöslichem und wasserunlöslichem Globulin unzureichend begründet oder auch, daß die fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat eine zur Trennung der verschiedenen Globuline wenig geeignete Methode ist (Halsam)⁵⁾. Man darf auch nicht übersehen, daß die Globulinfraktionen stets von anderen Serumbestandteilen verun-

¹⁾ Hofmeister und Pick, Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. **1**, 360 (1902).

²⁾ E. Fuld und K. Spiro, Über die labende und labhemmende Wirkung des Blutes. Zeitschr. f. physiol. Chemie **31**, 407 (1902).

³⁾ Porges und Spiro, Die Globuline des Blutserums. Beiträge zur chem. Pathol. und Physiol. **3**, 277 (1903).

⁴⁾ E. Freund und J. Joachim, Zur Kenntnis der Serumglobuline. Zeitschr. f. physiol. Chemie **36**, 407 (1902).

⁵⁾ Halsam, Journ. of Physiology **32**, 267 (1905).

reinigt sind, die die Löslichkeit und Fällbarkeit beeinflussen können. So kann, wie Hammarsten weiter dargetan hat, ein wasserlösliches Globulin durch geeignete Reinigung in ein wasserunlösliches umgewandelt werden, und umgekehrt geht das wasserunlösliche Globulin an der Luft in ein wasserlösliches über. Ein in Neutralsalzlösung unlöslicher Eiweißstoff, wie das Kasein, kann auch nach Hammarsten durch Verunreinigung mit Serumbestandteilen die Wasserlöslichkeit eines Globulins annehmen. Ferner hat Mörner gezeigt, daß eine Verunreinigung des Serumglobulins mit Seifen die Fällbarkeit desselben wesentlich verändert.

10. Serumalbumine.

Eigenschaften. Wie das Serumglobulin scheint auch das Serumalbumin ein Gemenge von mindestens zwei Eiweißstoffen zu sein. Mit Bestimmtheit kann man nur zwischen einem kristallisierbaren und einem amorphen Albumin, im Plasma und Serum unterscheiden. Das kristallisierte und amorphe Serumalbumin zeigt in wässriger Lösung die gewöhnlichen Albuminreaktionen. Die Gerinnungstemperatur liegt in 1prozentiger Lösung des salzarmen Albumins, etwa bei 50° C, steigt aber mit dem Kochsalzgehalt. Die salzhaltige Lösung des aus Serum ausgefällten Gemenges gerinnt gewöhnlich bei 70—85° C. Eine möglichst salzfreie Lösung gerinnt weder beim Kochen noch nach Zusatz von Alkohol; nach Zusatz von wenig Kochsalz gerinnt sie dagegen in beiden Fällen.

Das kristallinische Serumalbumin stellt nach K. Mörner¹⁾ eine Verbindung mit Schwefelsäure dar. Das aus der wässrigen Lösung der Kristalle mit Alkohol koagulierte Albumin hat fast dieselbe Zusammensetzung wie das aus Pferdeblutserum dargestellte, amorphe Albumingemenge (Michel²⁾). Die mittlere Zusammensetzung war C 53,06 Proz., H 6,98 Proz., N 15,99 Proz., S 1,84 Proz. (Hammarsten). Nach Mörner ist der Schwefel im kristallisierten Albumin, abgesehen von der Schwefelsäure, nur als Cystin vorhanden. Für die spezifische Drehung des kristallisierten Pferdeserumalbumins fand Michel²⁾ $[\alpha]_D = -61-61,2^\circ$.

Darstellung und quantitative Bestimmung. Zur Darstellung des Gesamtalbumins entfernt man nach Johansson³⁾ zuerst das Globulin durch Sättigung mit Magnesiumsulfat bei etwa 30° C und filtriert bei derselben Temperatur. Nach dem Erkalten wird filtriert, das Filtrat mit Essigsäure bis zu 1 Proz. versetzt, der dadurch entstandene Niederschlag abfiltriert, ausgepreßt, in Wasser unter Zusatz von Alkali bis zur neutralen Reaktion gelöst und die Lösung durch Dialyse von den Salzen befreit. Das Dialysat dampft man zur Trockne bei gelinder Temperatur ein und wägt das so erhaltene Albumin, oder man kann auch das Dialysat mit Alkohol fällen, sofort abfiltrieren, trocknen und wägen.

K. Starke⁴⁾ erhielt kristallisiertes Serumalbumin, indem er Pferdeblutserum durch halbe Sättigung mit Ammoniumsulfat vom Globulin befreite, das Filtrat mit mehr Ammoniumsulfat bis zur Trübung versetzte, nach mehrstündigem Stehen vom Niederschlage abfiltrierte, dem Filtrat 1prozentige Schwefelsäure bis zur beginnen-

¹⁾ K. Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chemie **34**, 253 (1902).

²⁾ Michel, Verhandl. der physiol.-mediz. Gesellschaft zu Würzburg **29**.

³⁾ Johansson, Zeitschr. f. physiol. Chemie **9**.

⁴⁾ K. Starke, Malys Jahresbericht **11**, p. 17. 1882.

den bleibenden Trübung zufügte und bei 40° C stehen ließ, wobei sich die Kristalle ausschieden.

Hopkins und Pinkus¹⁾ verfahren mit dem Filtrat von dem Globulinniederschlag in der Weise, daß sie zunächst konzentrierte Ammoniumsulfatlösung hinzufügen, bis ein deutlicher bleibender Niederschlag auftritt, dann mit destilliertem Wasser bis zum Verschwinden des Niederschlages versetzen und endlich bis zur deutlichen bleibenden Ausscheidung 10prozentige Essigsäure tropfenweise zusetzen.

Krieger²⁾ benutzt zur Ausfällung eine halb mit Ammoniumsulfat gesättigte $\frac{1}{10}$ Normalschwefelsäure, wobei das Albumin in Form von Kristalldrüsen sowie von Kristallnadeln erhalten wurde. Zum Umkristallisieren löste er den Kristallbrei in Wasser, versetzte die Lösung mit konzentrierter Ammoniumsulfatlösung bis zur beginnenden Fällung, wobei ein erneuter Säurezusatz nicht nötig war. Beim Umkristallisieren verschwinden die Kristalldrüsen, und es treten isoliert liegende Nadeln auf, die bei jedem Umkristallisieren kleiner werden.

11. Quantitative Bestimmung des Gesamteiweißes.

Man versetzt 20—50 ccm zentrifugiertes und filtriertes Blutserum oder Blutplasma mit dem vierfachen Volumen Alkohol, läßt stehen, bis sich der Niederschlag vollständig ausgeschieden hat, filtriert durch ein getrocknetes und gewogenes Filter, wäscht den Niederschlag mit heißem Wasser, Alkohol und dann mit Äther, trocknet bei 120° C und wägt nach dem Erkalten im Exsikkator. Hierauf verascht man durch Glühen im Platintiegel, wägt und zieht den gefundenen Wert von dem Gewicht des Trockenrückstandes ab, wodurch man die Menge Protein erhält.

12. Proteinsäuren.

Zur quantitativen Bestimmung der Proteinsäuren im Blut verfährt Browinski³⁾ in der Weise, daß er 1 Liter Serum mit dem fünf-fachen Volumen Wasser verdünnt, mit Essigsäure ansäuert, kocht und vom ausgefallenen Eiweiß ab filtriert. Das Filtrat wird im Vakuum auf 400 ccm eingeeengt, in 100 ccm der Stickstoff bestimmt und aus 300 ccm die Proteinsäuren in folgender Weise isoliert. Das Filtrat wird mit Quecksilberazetat und Natriumkarbonat bis zum Gelbwerden des Niederschlages versetzt, dieser sorgfältig nachgewaschen, mit Bariumhydroxyd behandelt, die Lösung der so erhaltenen Bariumsalze im Vakuum auf einige Kubikzentimeter eingedampft und mit dem

¹⁾ F. G. Hopkins und S. N. Pinkus, Über die Kristallisation tierischer Albuminstoffe. *Journ. of Physiol.* **23**, 130 (1898).

²⁾ H. Krieger, Über Darstellung kristallinischer tierischer Eiweißstoffe. Dissertation Straßburg 1899.

³⁾ J. Browinski, Über die Gegenwart von Proteinsäuren im Blute. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **58**, 134 (1908/09).

mehrfachen Volumen einer Alkohol-Äthermischung (2 : 1) versetzt, wodurch die Bariumsalze ausfallen. Diese werden auf dem Filter mit absolutem Alkohol ausgewaschen, in Wasser gelöst und der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

Die Proteinsäuren können auch bestimmt werden, indem man das enteiweißte Filtrat im Vakuum einengt, mit Schwefelsäure bis zur sauren Reaktion gegen Kongorot und mit dem doppelten Volumen Alkohol versetzt, filtriert, das Filtrat mit Wasser verdünnt und die freien Proteinsäuren in die Bariumsalze überführt, die Lösung auf einige Kubikzentimeter eindampft und in den Bariumsalzen den Stickstoff bestimmt.

13. Harnstoff.

Zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung des Harnstoffs versetzt man nach Hoppe-Seyler ¹⁾ das Blut oder Blutserum mit dem drei- bis vierfachen Volumen Alkohol, mischt gut durch, läßt 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, filtriert vom ausgeschiedenen Niederschlag ab, wäscht mehrmals mit Alkohol aus und dampft das Filtrat + Waschalkohol bei etwa 50° C oder im Vakuum bis zur Entfernung der Hauptmenge des Alkohols ein. Man bringt die Flüssigkeit in einen Scheidetrichter, säuert sie mit Essigsäure stark an, fügt Chloroform zu und schüttelt gut durch, wobei Phosphatide, Seifen, Cholesterin vom Chloroform aufgenommen werden. Die Chloroformschicht wäscht man gut mit Wasser aus, das Waschwasser vereinigt man mit der alkoholisch-wässrigen Lösung, dampft den Alkohol bei mäßiger Temperatur ab, säuert nach dem Erkalten mit Schwefelsäure stark an und versetzt mit Phosphorwolframsäure, wodurch Peptone, Kreatinin und etwa vorhandene Basen gefällt werden. Der Niederschlag wird nun wiederholt mit schwefelsäurehaltigem Wasser gewaschen, das Filtrat mit Barytwasser übersättigt, der überschüssige Baryt durch Kohlensäure entfernt, das Filtrat vom Bariumkarbonat eingedampft und der Harnstoff mit salpetersaurem Quecksilberoxyd gefällt, wobei zur Neutralisation der freiwerdenden Schwefelsäure Barytwasser angewendet und die Flüssigkeit bis zum Ende sauer erhalten wird. Hierauf neutralisiert man mit Barytwasser, filtriert den Niederschlag ab, wäscht ihn wiederholt mit wenig Wasser nach, suspendiert ihn in Wasser und entfernt das Quecksilber mit Schwefelwasserstoff. Zur Entfernung des noch vorhandenen salpetersauren Bariums erwärmt man das Filtrat zum Verjagen des Schwefelwasserstoffs, versetzt mit Bariumkarbonat, dampft auf dem Wasserbade bis zur Trockne ein, zieht den Rückstand mit absolutem Alkohol aus, filtriert, versetzt das Filtrat mit dem gleichen Volumen Essigäther, wodurch die letzten Spuren des salpetersauren Bariums ausgefällt werden, filtriert und verdampft zur Trockne. Bei Wiederholung dieser Prozedur erhält man den Harnstoff vollständig frei von salpetersaurem

¹⁾ Hoppe-Seyler, Handbuch der physiologisch-chemischen Analysen.

Barium und wägt. — Der so erhaltene Harnstoff enthält nach Letsche¹⁾ ölige Beimengungen und stickstoffreiche Substanzen, die nach Gottlieb²⁾ in der Weise entfernt werden können, daß man den Harnstoff in wenig Alkohol löst und mit einer ätherischen Oxalsäurelösung verdunstet, den Rückstand mit Äther von überschüssiger Oxalsäure auswäscht, in Wasser löst und die Oxalsäure durch Titration mit $n/20$ Barytlösung bestimmt. 1 ccm Barytlösung entspricht 3 mg Harnstoff. Da der oxalsäure Harnstoff in Äther etwas löslich ist, muß dem erhaltenen Harnstoffwert für je 10 ccm Waschflüssigkeit 0,1 mg hinzuaddiert werden.

14. Kreatin und Kreatinin.

Kreatin. Man entfernt durch Kochen des Blutserums die Eiweißstoffe, fällt das Filtrat mit Bleiessig unter Vermeidung eines Überschusses, filtriert, entfernt das Blei aus dem Filtrate durch Schwefelwasserstoff, filtriert wieder, engt auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen ein, läßt die Lösung an einem kühlen Orte stehen, filtriert die ausgeschiedenen Kristalle ab und wäscht sie auf einem getrockneten und gewogenen Filter mit etwas 88prozentigem Alkohol aus, trocknet bei 100° C und wägt.

Der Nachweis und die Bestimmung des Kreatins geschieht am besten durch Überführung desselben in Kreatinin, indem man es mit 2,5—3prozentiger Salzsäure auf dem Wasserbade unter Rückflußkühler 3—4 Stunden kocht, das entstandene Kreatinin mit Phosphorwolframsäure ausfällt, den Niederschlag mit Barytwasser kocht, den überschüssigen Baryt durch Kohlensäure entfernt, das Filtrat zur Trockne eindampft und den Trockenrückstand mit Alkohol extrahiert. Beim Verdunsten des Alkoholauszuges scheiden sich Kreatinkristalle aus (s. Harn).

Kreatinin. Das Filtrat vom Kreatin dampft man nach Zusatz von Bariumkarbonat zur Trockne ein, extrahiert den Rückstand mit absolutem Alkohol, filtriert und versetzt das eingeeengte alkoholische Filtrat mit säurefreier Chlorzinklösung vom spezifischen Gewicht 1,2 und läßt einige Tage stehen. Das Kreatinin scheidet sich dabei als Chlorzinkverbindung aus, die mit Bleihydroxyd gekocht, abfiltriert und das Filtrat mit Hilfe der beim Harn angegebenen Reaktionen geprüft und quantitativ bestimmt wird.

15. Ammoniak.

Man mißt in einem 45 cm hohen Areometerzylinder von 5 cm Durchmesser 50 ccm Blut oder Blutserum ab, stellt den Zylinder in Eis, fügt 16 g Natriumchlorid, 25 ccm Methylalkohol und 5 g kristallisiertes Natriumkarbonat hinzu, leitet einen starken von NH_3 befreiten Luftstrom etwa 5 Stunden durch den Zylinder und von hier durch die Vorlage mit $1/10$ Schwefelsäure, wobei man nach den ersten 2 Stunden Methylalkohol zusetzt. Am Ende der Luftdurchleitung bringt man die Vorlage in ein Wasserbad von 30—35° C, um die Kohlensäure zu entfernen. Weiter verfährt man wie beim Harn.

¹⁾ E. Letsche, Beiträge zur Kenntnis der organischen Bestandteile des Serums. Zeitschr. f. physiol. Chemie 53, 31 (1907).

²⁾ Gottlieb, Archiv f. experim. Pathologie und Pharmakologie 42, 238 (1899).

16. Harnsäure.

Man erhitzt das Blutserum zum Sieden, filtriert das Eiweiß heiß ab, dampft das Filtrat zur Trockne ein, zieht den Rückstand mehrmals mit kochendem Wasser aus, filtriert heiß, dampft auf ein kleines Volumen ein, versetzt mit Essigsäure und läßt 24—48 Stunden stehen, wobei sich Kristalle der Harnsäure ausscheiden, die nach der beim Harn angegebenen Vorschrift gereinigt werden.

Zum Nachweis und zur Bestimmung der Harnsäure verfährt Schröder ¹⁾ in der Weise, daß er das mit 5 Volumen Wasser verdünnte Blut oder Serum mit Essigsäure versetzt, um das Eiweiß zu entfernen, das Filtrat zur Trockne eindampft und den Rückstand mit heißem Wasser auszieht. Die trübe Lösung versetzt er mit Magnesiumsulfat und Natriumkarbonat, filtriert vom ausgeschiedenen Niederschlag ab, fällt das klare Filtrat (wie beim Harn) mit Magnesiamischung (100 g kristallisiertes Magnesiumchlorid, 200 g Chlorammonium löst man in Wasser, fügt Ammoniak bis zum starken Geruch zu und füllt mit destilliertem Wasser zum Liter auf) und Silbernitrat, wäscht den Niederschlag mit Ammoniak bis zur Entfernung des Chlorsilbers aus und zerlegt durch Schwefelwasserstoff. Hierauf dampft er ohne zu filtrieren nach Zusatz von etwas verdünnter Essigsäure ein, fügt zum Rückstand einige Tropfen Sodalösung zu, kocht mit heißem Wasser aus und filtriert in ein mit etwas Essigsäure beschicktes Becherglas. Die eingeeengte Lösung scheidet beim Stehen an einem kühlen Orte Kristalle der Harnsäure ab, die gewogen werden.

17. Kohlehydrate.

Um den Zucker im Blut, Blutplasma, Blutserum usw. nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen, müssen zuerst diejenigen Stoffe entfernt werden, die dieselben Reaktionen geben wie der Zucker, wie z. B. die Drehung des polarisierten Lichtes, die Reduktion des Kupferoxyds usw.

Methode von Cl. Bernard. Zum Nachweis des Traubenzuckers im Blut oder Serum eignet sich das Verfahren von Cl. Bernard, das im folgenden besteht. Man fängt das Blut über Natriumsulfat zu gleichen Teilen in einer Porzellanschale auf und erwärmt die Mischung unter fortwährendem Umrühren bis zum Kochen und erhält im Kochen bis zum vollständigen Verschwinden der roten Farbe. Man bringt die ausgeschiedene Masse auf ein Filter und drückt sie mit einem Spatel aus; in der ablaufenden Flüssigkeit weist man den Zucker in bekannter Weise nach.

Methode von Patéin und Dufau ²⁾. Fällung mit Merkurinitrat.

Die dazu erforderliche Merkurinitratlösung erhält man, indem man 220 g gelbes Quecksilberoxyd mit 300—400 ccm Wasser fein verteilt, unter Umschütteln und Erwärmen mit so viel Salpetersäure versetzt, bis Lösung eintritt, worauf man zum Liter auffüllt und filtriert.

Man versetzt 50 ccm defibriniertes Blut mit der gleichen Menge destillierten Wassers, wodurch das Blut lackfarben wird, fügt unter

¹⁾ v. Schröder, Ludwig-Festschrift 1887, 89.

²⁾ G. Patéin und Dufau, De l'emploi du nitrate acide de mercure dans l'analyse de liquides sucrées. Journ. de Pharm. et de Chimie (6) 15, 221 (1902).

fortwährendem Umschütteln 40 ccm Merkurinitratlösung hinzu, läßt den ausgeschiedenen Niederschlag sämtlicher stickstoffhaltiger Substanzen sich absetzen und neutralisiert tropfenweise mit 37prozentiger (spezifisches Gewicht 1,3) Natronlauge. Das auf 15 ccm aufgefüllte Filtrat darf auf Zusatz von Natronlauge keinen Niederschlag mehr geben. In einem aliquoten Teil des Filtrates entfernt man das überschüssige Quecksilber durch Schwefelwasserstoff, filtriert vom Niederschlag ab, verjagt den Schwefelwasserstoff durch einen Luftstrom oder Kochen und bestimmt dann den Zucker durch Polarisaton, Titration oder gewichtsanalytisch.

Methode von Schenck¹⁾. Fällung durch Sublimat und Salzsäure.

50 ccm defibriniertes oder in Fluornatrium aufgefangenes Blut werden mit ebensoviel Wasser verdünnt, mit 100 ccm 2prozentiger Salzsäure und 100 ccm 5prozentiger Sublimatlösung versetzt. Das Filtrat wird durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit. Aus einem aliquoten, genau gemessenen Teil des Filtrates verjagt man den Schwefelwasserstoff durch einen Luftstrom und bestimmt den Zuckergehalt.

Methode von Abeles-Bang²⁾. Fällung durch Zinkazetat in alkoholischer Lösung.

Man füllt ein etwa 200 ccm fassendes Zentrifugenröhrchen mit 100 ccm Alkohol und 2,5 g Zinkazetat, wägt, läßt 50 ccm Blut aus der Ader einfließen und wägt wieder. Die sich bildenden Blutkoagula zerteilt man mit einem Glasstabe, bis der Niederschlag eine gleichmäßig schwarzgraue Masse bildet, spült den Glasstab ab und bringt die Masse in das Röhrchen. Hierauf zentrifugiert man eine Stunde, gießt die Flüssigkeit in ein Becherglas, zerreibt den Rückstand mit 100 ccm Alkohol und zentrifugiert wieder eine Stunde. Die Flüssigkeit wird nun zum drittenmal mit 50 ccm zerrieben und noch eine Stunde zentrifugiert. Die vereinigten Flüssigkeiten werden mit konzentrierter Sodalösung schwach alkalisch gemacht, der entstandene Niederschlag abfiltriert und ausgewaschen, das Filtrat mit Essigsäure schwach angesäuert, auf dem Wasserbade stark eingeeengt, mit einigen Tropfen Zinkazetatlösung und dann Sodalösung versetzt, filtriert und das Filtrat zur Zuckerbestimmung verwendet.

Dieses Verfahren änderte Bang³⁾, indem er das Blut nur mit Alkohol ohne Zinkazetat gefällt hat, die vereinigten alkoholischen

¹⁾ F. Schenck, Über Bestimmung und Umsetzung des Blutzuckers. Pflügers Archiv 55, 203 (1894).

²⁾ Abeles, Zeitschr. f. physiol. Chemie 15, 495. — J. Bang, Über die Verwendung der Zentrifuge in der quantitativen Analyse. Festschrift für O. Hammarsten 1906.

³⁾ Ivar Bang, Über die Bestimmung des Blutzuckers. Biochem. Zeitschr. 7, 327 (1908).

Flüssigkeiten auf dem Wasserbade bis auf etwa 10 ccm einengte, den Rückstand, je nach der Blutmenge und dem Zuckergehalt, auf 30—50 ccm auffüllte, mit 2—3 g Kaolin ausschüttelte, wodurch Phosphatide und Fett entfernt werden und im Filtrat den Zuckergehalt nach seiner Methode bestimmte.

Später modifizierte Bang in Gemeinschaft mit Lyttkens und Sandgren ¹⁾ das Verfahren in der Weise, daß man 10—50 ccm Blut oder Serum mit 150 ccm Alkohol vermischt, auf der Nutsche filtriert und stark absaugt, die Masse dann zweimal mit je 50 ccm Alkohol zerreibt und abnutschet. Die vereinigten Filtrate dampft man auf dem Wasserbade bis auf ein kleines Volumen ein, löst den Rückstand in wenig Wasser auf und fällt durch Ferrum oxydatum dialysatum oder mit Blutkohle und 5 ccm 25prozentiger Salzsäure (Bang und Bohmansson) ²⁾. Im Filtrate wird der Zucker bestimmt. Weder die titrimetrische noch die polarimetrische Bestimmung geben den richtigen Gehalt an Traubenzucker; die einzig zuverlässige Methode hierzu ist die Bestimmung des Zuckers durch die Differenz vor und nach der Gärung, am besten durch Titration.

Methode von Rona und Michaelis ³⁾. Enteiweißung mit Kaolin.

50 ccm Blutplasma oder Blutserum werden mit der 15fachen Menge Wasser verdünnt, mit Essigsäure schwach angesäuert, bis die entstehende Trübung wieder zu verschwinden beginnt, dann fügt man unter fortwährendem Umschütteln auf je 100 ccm der genau gemessenen Flüssigkeit 20—25 g Kaolin in kleinen Portionen hinzu. Hierauf nutschet man ab, engt das Filtrat ein, filtriert vom etwa mitgerissenen Kaolin ab, mißt das Volumen des Filtrats, das gewöhnlich $\frac{4}{5}$ der Gesamtflüssigkeit beträgt. Da die Konzentration des Filtrates genau die gleiche wie die der im Kaolin zurückbleibenden Flüssigkeit ist, kann die gefundene Zuckermenge auf die Gesamtflüssigkeit umgerechnet werden. Nun wird das Filtrat bis zur geeigneten Konzentration eingeeengt und darin der Zucker bestimmt.

Methode von Rona und Michaelis. Enteiweißung mit kolloidalem Eisenhydroxyd.

50 g Blutserum oder Blutplasma werden auf das 10—12fache mit Wasser verdünnt und mit 40 ccm Ferrum oxydatum dialysatum tropfenweise unter beständigem Umschütteln versetzt, wodurch das Eiweiß vollständig ausgefällt wird. Man filtriert sofort ab, engt das Filtrat auf 10—15 ccm ein und bestimmt darin den Zuckergehalt.

¹⁾ I. Bang, Lyttkens und Sandgren, Zeitschr. f. physiol. Chemie **65**, 497 (1910).

²⁾ I. Bang und Bohmansson, Zeitschr. f. physiol. Chemie **63**, 443 (1909).

³⁾ P. Rona und L. Michaelis, Untersuchungen über den Blutzucker. Biochem. Zeitschr. **7**, 329 (1908).

Zur vollständigen Enteiweißung ist Einhaltung der angegebenen Mengenverhältnisse erforderlich.

18. Milchsäure.

Zum Nachweis und zur Bestimmung der Milchsäure verdünnt man das Blut oder Blutserum mit mehreren Volumen Wasser, fällt das Eiweiß durch Kochen mit Schwefelsäure, filtriert, wäscht den Niederschlag aus, neutralisiert das Filtrat mit Baryt und dampft die filtrierte Lösung bis zur Sirupkonsistenz ein. Den Sirup extrahiert man erschöpfend mit Alkohol, destilliert den Alkohol ab, befreit den Rückstand vom Fett durch Schütteln mit Äther, löst ihn dann in Wasser, fügt das gleiche Volumen verdünnte Phosphorsäure hinzu und schüttelt die Mischung mit größeren Mengen Äther aus, der zugleich mit etwas Phosphorsäure die ganze Menge Milchsäure aufnimmt. Der Äther der vereinigten Auszüge wird nun abdestilliert, der Rückstand in Wasser gelöst, die Lösung mit Zinkkarbonat gekocht, filtriert, mit heißem Wasser gewaschen, das Filtrat und Waschwasser auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen eingedampft und der Kristallisation überlassen. Die Mutterlauge liefert auf Zusatz von Alkohol nach einigem Stehen weitere Kristalle (Araki ¹⁾).

Quantitativ genauere Resultate dürfte man gewinnen, wenn man nach Entfernung des Äthers die Milchsäure nach von Fürth und Charneiß ²⁾ bestimmt, indem man den Rückstand in 1% schwefelsaurem Wasser löst und durch tropfenweisen Zusatz von $\frac{1}{10}$ n Permanganate die Milchsäure zu Aldehyd CO_2 und H_2O oxydiert. Das Acetaldehyd wird unter guter Kühlung abdestilliert, in Wasser aufgefangen und nach Ripper ³⁾ mit Kaliumhydrosulfatlösung im Überschuss versetzt und mit Jodlösung titrimetrisch der Überschuss bestimmt.

19. Azeton.

Quantitative Bestimmung. Man versetzt 150 ccm Blut mit der gleichen Menge Wasser und je der doppelten Menge 2prozentiger Salzsäure und 5prozentiger Quecksilberchloridlösung, rührt gut durch und filtriert durch ein großes Faltenfilter, sobald sich der Eiweißniederschlag abgesetzt hat. Von dem so erhaltenen Filtrat werden 500 ccm unter guter Kühlung destilliert und 25 Minuten im Sieden erhalten, wobei etwa 60 ccm in die mit 150 ccm kaltem Wasser beschickte Vorlage übergehen. Die Titration erfolgt in derselben Weise wie beim Harn.

¹⁾ Araki. Über die Bildung von Milchsäure und Glukose im Organismus bei Sauerstoffmangel. *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **15**, 355. Über die chemischen Änderungen der Lebensprozesse infolge von Sauerstoffmangel. *Ebenda* **19**, 422 (1894).

²⁾ Bioch. Zeitschrift **26**, 1908, S. 199.

³⁾ Ripper, Monatshefte f. Chemie **21**, 1079.

G. Blutfarbstoffe.

1. Oxyhämoglobin.

Eigenschaften. Das Oxyhämoglobin bildet blutrote, durchsichtige, seideglänzende Nadeln, Prismen, Tetraeder oder Tafeln, die dem rhombischen System gehören, nur das Oxyhämoglobin des Eichhörnchenblutes kristallisiert in sechseckigen Tafeln des hexagonalen Systems. Bei niedriger Temperatur über Schwefelsäure getrocknet, können die Kristalle ohne Zersetzung auf 110 bis 115° C erhitzt werden; bei höherer Temperatur, über 160° C, zersetzen sie sich unter Entwicklung eines Geruches nach verbranntem Horn und geben eine aus Eisenoxyd bestehende Asche. Es löst sich in Wasser mit feurig blutroter Farbe, in Alkohol, Äther, Benzol, Chloroform ist es unlöslich. Verdünnte wässrige Lösungen sind haltbarer als konzentrierte; in sehr verdünnter Lösung von Alkalikarbonat löst es sich leichter als in reinem Wasser, und die Lösung scheint auch etwas haltbarer zu sein. Eine wässrige Lösung wird von neutralem und basischem Bleiazetat, auch auf Zusatz von Ammoniak nicht gefällt, erst beim Stehen bilden sich infolge von Zersetzungen Fällungen. Durch Kaliumkarbonat und Ammoniumsulfat, sowie Alkohol werden konzentrierte wässrige Lösungen bei Sättigung gefällt, wobei der zuerst entstehende rote Niederschlag infolge einer Spaltung in Eiweiß und Hämatin allmählich braun wird. Es gibt mit mehreren Eiweißreagenzien die gewöhnlichen Eiweißreaktionen, wobei zuerst eine Abspaltung von Eiweiß stattfindet.

Spektrum des Oxyhämoglobins. Bei verdünnter Oxyhämoglobininlösung oder bei arteriellem Blut beobachtet man im Spektrum zwei Absorptionsstreifen zwischen den Fraunhoferschen Linien D und E. Der weniger breite, aber dunklere und schärfere Streifen α liegt an der Linie D, der zweite, der breitere, weniger scharfe und weniger dunkle β liegt bei E. Die Mitte des ersten Streifens entspricht einer Wellenlänge $\lambda = 578,1$, die des zweiten 541,7 (Formanek)¹⁾. Diese Streifen sind noch bei einem Gehalte von 0,1 Promille Oxyhämoglobin in einer Schicht von 1 cm Dicke sichtbar; bei stärkerer Verdünnung verschwindet erst der Streifen β . Bei noch viel weiterer Verdünnung sind die von Gamgee entdeckten Absorptionsstreifen im Violett (Wellenlänge 415 $\mu\mu$) erkennbar. — Rost²⁾ hat schöne Photographien derselben hergestellt.

Darstellung. Nach Hoppe-Seyler³⁾ werden die gewaschenen Blutkörperchen mit 2 Volumen Wasser angerührt und mit Äther geschüttelt, der Äther abgegossen, die dunkel lackfarbene Blutlösung von dem anhaftenden Äther durch Verdunstenlassen in offenen Schalen an der Luft befreit, die filtrierte Blutlösung auf 0° C abgekühlt, mit $\frac{1}{4}$ Volumen abgekühlten Alkohols unter Umrühren versetzt und einige Tage bei — 5° C bis — 10° C stehen gelassen. Hierauf werden die abgeschiedenen Kristalle in Wasser von 35° C gelöst, die Lösung abgekühlt und durch abgekühlten Alkohol wiederholt gefällt. Die zuletzt ausgeschiedenen Kristalle werden mit abgekühltem alkoholhaltigen Wasser gewaschen und im Vakuum bei 0° C getrocknet.

Man kann auch so verfahren, daß man das defibrierte Blut mit dem zehnfachen Volumen einer Chlornatriumlösung (1 Teil gesättigter Lösung und 9 Teile Wasser) mischt und die Mischung 1—2 Tage in flachen Schalen an einem kühlen Orte stehen läßt oder den Absatz der roten Blutkörperchen durch Zentrifugieren beschleunigt. Die Flüssigkeit gießt man ab, den dicken Blutkörperchenbrei bringt man

¹⁾ Formanek, Zeitschr. f. analyt. Chemie **40**, 505 (1901).

²⁾ Rost Franz u. Heise. Beiträge zur Photographie der Blutspektren. Arb. aus d. Kaiserl. Gesundheitsamt **32**. Heft 2. 1909.

³⁾ Hoppe-Seyler, Beiträge zur Kenntnis des Blutes des Menschen und der Wirbeltiere. Mediz.-chemische Untersuchungen **2**, 181 (1867).

mit nicht zu viel Wasser in einen Scheidetrichter, setzt das gleiche Volumen Äther zu, schüttelt gut durch, filtriert die dunkelrote wässrige Lösung, läßt auf 0° C abkühlen und verfährt weiter, wie oben angegeben ist.

Nach Hofmeister ¹⁾ und seinen Schülern verdünnt man Blutkörperchen von durch Oxalatzusatz ungerinnbar gemachtem Pferdeblut mit dem doppelten Volumen Wasser, kühlt ab, rührt mit 50 bis 70 ccm Äther pro Liter Mischung gut durch und versetzt unter fortwährendem Umrühren mit 700 ccm gesättigter Ammoniumsulfatlösung pro Liter Mischung. Es entsteht dabei allmählich ein Niederschlag, der sich nach 5—15 Minuten von selbst oder nach Zusatz von wenig Äther hebt. Nach einigem Stehen in der Kälte filtriert man die dunkelgranatroten Flüssigkeit von dem blaßroten Niederschlag ab und läßt das Filtrat in Porzellanschalen bei Zimmertemperatur unter öfterem Umrühren 3 Tage stehen. Es scheiden sich prächtige granatähnliche Kristalle aus, die durch Lösung in möglichst wenig Wasser und Versetzen mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung (80 : 100) umkristallisiert werden.

Die von Arthus ²⁾ und unabhängig von ihm von Frey ³⁾ vorgeschlagene Dialysationsmethode zur Darstellung des Oxyhämoglobins wird nach Schuurmanns-Stekhoven ⁴⁾ in folgender Weise ausgeführt. Man wäscht auf der Zentrifuge rote Blutkörperchen mit 1 prozentiger Kochsalzlösung und schüttelt sie 2 Stunden mit Asbestflocken, wobei sich der Blutfarbstoff in der Salzlösung löst, während die Stromata größtenteils an den Asbestflocken kleben bleiben und so durch Filtration entfernt werden können. Die Blutfarbstofflösung bringt man in einen Pergamentschlauch, den man in 45 prozentigen Alkohol eintaucht, und stellt in den Eisschrank, wobei sich nach 24 bis 40 Stunden Oxyhämoglobinkristalle an der Dialysationswand absetzen. Man bringt dann den Inhalt in ein zylindrisches Gefäß und läßt im Eisschrank bis zum vollständigen Auskristallisieren stehen. Hierauf löst man die ausgeschiedenen Kristalle in möglichst wenig Wasser von 37° C und dialysiert im Eisschrank gegen 45 prozentigen Alkohol.

2. Hämoglobin.

Eigenschaften. Das Hämoglobin unterscheidet sich von dem Oxyhämoglobin durch das Fehlen des locker gebundenen Sauerstoffs. Seine Kristalle sind von prächtig dunkelroter Farbe, den Oxyhämoglobinkristallen isomorph, aber leichter in Wasser löslich. An der Luft wandeln sie sich unter Sauerstoffaufnahme in Oxyhämoglobinkristalle um; ihre Lösung ist dunkler als eine Oxyhämoglobinlösung von gleicher Konzentration, wird ebenso wie diese weder

¹⁾ Hofmeister, Zeitschr. f. physiol. Chemie **28**, 182 (1899).

²⁾ M. Arthus, Verfahren, das gestattet, leicht und schnell Kristalle von Oxyhämoglobin zu erhalten. Compt. rend. de la Soc. de Biol. **47**, 686 (1895).

³⁾ H. Frey, Beiträge zur Kenntnis der Blutkristalle. Dissertation, Würzburg 1894.

⁴⁾ Schuurmanns-Stekhoven, Darstellung von kristallisiertem Oxyhämoglobin. Zeitschr. f. physiol. Chemie **33**, 296 (1901).

durch neutrales, noch durch basisches Bleiazetat, auch nicht nach Zufügen von Ammoniak gefällt.

Spektrum. Die wässrige Lösung des Hämoglobins absorbiert weniger stark die blauen und violetten Lichtstrahlen im Spektrum, als eine gleichkonzentrierte Oxyhämoglobinlösung, absorbiert aber stärker das Licht in den zwischen C und D gelegenen Teilen desselben. Bei passender Verdünnung zeigt die Lösung im Spektrum einen einzigen breiten, nicht scharf begrenzten Streifen zwischen D und E, dessen dunkelste Stelle der Wellenlänge $\lambda = 555$ entspricht. Dieser Streifen liegt jedoch nicht in der Mitte zwischen D und E, sondern ist nach dem roten Teile des Spektrums etwas verschoben.

Darstellung. Das Hämoglobin entsteht, wenn man durch eine Oxyhämoglobinlösung indifferente Gase leitet oder durch Zusatz einer reduzierenden Substanz (wie Schwefelammonium oder einer ammoniakalischen Ferrotartratlösung (Stockessche Reduktionsflüssigkeit), oder wenn man sie im Vakuum stehen und wenn man sie bei Luftabschluß faulen läßt. Wird eine Oxyhämoglobinlösung oder arterielles Blut in einem zugeschmolzenen Glasrohre der Fäulnis überlassen, so findet allmählich eine Sauerstoffzehrung und Reduktion des Oxyhämoglobins zu Hämoglobin statt, das sich bei genügender Konzentration der Lösung und bei niedriger Temperatur in Kristallen ausscheidet (Hüfner).

Nencki und Sieber¹⁾ verfahren in der Weise, daß sie eine Lösung von Pferdeoxyhämoglobin in warmem Wasser in einer mit Zu- und Ableitungsrohr versehenen Flasche mit faulem Blut versetzen, durch einen Wasserstoffstrom die Luft vertreiben, währenddessen die Leitungsröhren zuschmelzen und dann die Flasche 8—14 Tage bei 20—25° C stehen lassen. Die Bakterien verzehren während dieser Zeit den Sauerstoff. Man zieht dann über das Ableitungsröhrchen einen Gummischlauch, der in abgekühlten absoluten Alkohol eintaucht, öffnet die Spitze des Ableitungsrohres durch Abbrechen und saugt durch abwechselndes Erwärmen und Abkühlen der Flasche 25 Volumprocente Alkohol zu der Hämoglobinlösung, läßt 24 Stunden bei 5—10° C stehen, wobei das Hämoglobin in schönen glitzernden Tafeln und Prismen auskristallisiert.

3. Methämoglobin.

Eigenschaften. Das Methämoglobin kristallisiert in braunroten Nadeln, Prismen oder sechsseitigen Tafeln, die sich in Wasser leicht lösen. Die neutralen und sauren Lösungen sind braun, die alkalischen schön rot. Durch Bleiessig und Ammoniak wird die Lösung des reinen Methämoglobins gefällt (Unterschied von Hämoglobin- und Oxyhämoglobinlösungen).

Spektrum. Die alkalische Lösung des Methämoglobins zeigt zwei Absorptionsstreifen, die den zwei Oxyhämoglobinstreifen ähnlich sind, von diesen aber dadurch sich unterscheiden, daß der Streifen β stärker als α ist. Neben dem Streifen α und mit ihm, wie durch einen Schatten verbunden, liegt ein dritter schwacher Streifen zwischen C und D, nahe bei D. Nach Araki und Dittrich zeigt eine neutrale oder schwach saure Methämoglobinlösung nur einen charakteristischen Streifen α zwischen C und D, dessen Mitte etwa $\lambda = 634$ entspricht.

Darstellung. Man versetzt eine möglichst konzentrierte Oxyhämoglobinlösung aus Pferde-, Schweine- oder Hundeblut mit so viel

¹⁾ M. Nencki und N. Sieber, Venöse Hämoglobinkristalle. Chemische Berichte **19**, 128 (1886).

einer 10prozentigen Ferrizyankaliumlösung, bis die Mischung eine porterbraune Farbe angenommen hat, kühlt auf 0°C ab, versetzt mit dem $\frac{1}{4}$ Volumen abgekühlten Alkohols und läßt einige Tage in der Kälte stehen, wobei sich braune Kristalle, meist feine Nadeln ab scheiden. Die Kristalle werden aus wässriger Lösung durch Zusatz von Alkohol gereinigt (Hüfner und Otto)¹⁾.

4. Zyanhä moglobin (Zyanmethä moglobin).

Eigenschaften. Das Zyanhä moglobin kristallisiert teils in langen hygroskopischen Prismen mit 5,7 Proz. Kristallwasser, teils in Rhomben, die weniger hygroskopisch sind und 10,4 Proz. Kristallwasser haben. Es löst sich leicht in Wasser mit roter, einen Stich ins Gelbliche zeigender Farbe.

Das Zyanhä moglobin zeigt in neutraler wie schwach alkalischer Lösung, ähnlich dem Hä moglobinspektrum, einen breiten Streifen im Grün, aber etwas näher nach Violett.

Darstellung. Die in oben angegebener Weise hergestellten Methä moglobinkristalle werden in eine $\frac{1}{2}$ prozentige Blausäurelösung eingetragen, wobei sofort Lösung eintritt und die rehbraune Farbe gleichzeitig in Rot umschlägt. Die Lösung wird mit destilliertem Wasser bis zu 25—30 Proz. Farbstoff verdünnt, mit $\frac{1}{4}$ Volumen auf 0°C abgekühlten Alkohols versetzt, bei -10°C 1—2 Tage stehen gelassen, wodurch man eine reichliche Auscheidung mikroskopischer Kristalle von Zyanhä moglobin erhält. Aus Oxyhä moglobulin erhält man es durch mehrstündige Einwirkung einer 0,5prozentigen Blausäurelösung bei Körpertemperatur (Kobert, v. Zeynek)²⁾.

5. Kohlenoxydhä moglobin.

Eigenschaften. Die Kristalle des Kohlenoxydhä moglobins sind denen des Oxyhä moglobins isomorph, sind aber schwerer löslich, beständiger, und die Farbe geht mehr ins Blaurot. Beim Stehen an der Luft verwandelt sich Kohlenoxydhä moglobin in Lösung zuerst in Oxyhä moglobin und dann in Methä moglobin. Es dreht rechts und ebenso stark wie Oxyhä moglobin $[\alpha]_{\text{D}} = +10,0$ (Gamgee).

Spektrum. Die wässrige Lösung absorbiert das blaue Licht weniger als die Oxyhä moglobinlösungen und zeigen ähnlich dem Oxyhä moglobin zwei Streifen zwischen den Linien D und E, die aber etwas mehr nach dem violetten Teile des Spektrums verschoben sind. Die Mitte des ersteren entspricht $\lambda = 572$, die des zweiten $\lambda = 536$. Diese Streifen verändern sich nicht mehr merkbar auf Zusatz von reduzierenden Stoffen, was zum Unterschied vom Oxyhä moglobin dient. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Oxyhä moglobin und Kohlenoxydhä moglobin erhält man auf Zusatz ammoniakalischer Ferrotartratlösung ein gemischtes Spektrum von Hä moglobin und Kohlenoxydhä moglobin.

Darstellung. Um Kristalle von Kohlenoxydhä moglobin zu gewinnen, leitet man durch eine genügend konzentrierte Oxyhä moglobinlösung Kohlenoxyd und behandelt die so erhaltene Lösung nach der für Oxyhä moglobin angegebenen Vorschrift.

¹⁾ G. Hüfner und J. Otto, Kristallisiertes Methä moglobin **7**, 65 (1882/83).

²⁾ Kobert, Über Zyanmethä moglobin. Pflügers Archiv **82**, 603 (1900). — R. v. Zeynek, Über kristallisiertes Zyanhä moglobin. Zeitschr. f. physiol. Chemie **33**, 426 (1901).

6. Stickoxydhämoglobin.

Das Stickoxydhämoglobin erhält man durch Einleiten von Stickoxyd in eine Lösung von Kohlenoxydhämoglobin nach dem beim Oxyhämoglobin beschriebenen Verfahren oder durch Schütteln einer Methämoglobinlösung mit Stickoxyd. Es bildet eine kristallisierende molekulare Verbindung, die noch fester ist als Kohlenoxydhämoglobin. Die Kristalle sind denen des Oxyhämoglobins isomorph und haben auch genau dieselbe Farbe. Die Lösung zeigt zwei Absorptionsstreifen, die weniger scharf und mehr blaß sind als die Kohlenoxydhämoglobinkristalle, wie diese durch Zusatz von reduzierenden Stoffen nicht verschwinden.

7. Kathämoglobin.

Eigenschaften. Das Kathämoglobin ist in Wasser und Alkohol unlöslich, löst sich aber beim Erwärmen in kochsalzhaltigem Alkohol mit schön roter Farbe. Diese Lösung zeigt zwei Streifen zwischen D und b, einen schmäleren und schwächeren nach D zu und einen breiteren bis zur Linie b reichenden. Beim Erhitzen färbt sich die Lösung braun, und es tritt das Spektrum des alkalischen Hämatins auf, beim Erkalten kehrt die rote Farbe und das ursprüngliche Spektrum wieder zurück. Fügt man einer mit Alkali versetzten Lösung eine ammoniakalische Ferrotartratlösung hinzu, so beobachtet man die beiden Streifen des Hämochromogens.

Darstellung. Man versetzt 100 ccm einer möglichst konzentrierten Blutfarbstofflösung mit 200 ccm 96prozentigen Alkohols und 1—2 ccm gesättigter Kalilauge, erhitzt auf 60° C, neutralisiert mit Salzsäure, kühlt ab und verdünnt stark mit destilliertem Wasser, wobei ein Niederschlag entsteht, der mit Wasser nachgewaschen, dann in 60prozentigem Alkohol unter Zusatz von Kochsalz bei 60° C gelöst und mit Wasser wieder gefällt wird.

8. Hämözyanin ¹⁾.

Eigenschaften. Hämözyanin bildet ein kristallinisches blaues Pulver. Die blaue Lösung, sowohl die durch Dialyse salzfrei gemachte als die kochsalzhaltige, beginnt bei 68° C zu opaleszieren und gerinnt bei 72° C vollständig. Durch Sättigung der Lösung mit Ammoniumsulfat, Zinksulfat und Kupfersulfat fällt das Hämözyanin aus, mit Magnesiumsulfat nicht. Die Eiweißreaktionen fallen positiv aus. Versetzt man mit verdünnter Salzsäure, so fällt unter Verschwinden der Blaufärbung und Abspaltung von Kupfer ein weißer, flockiger Körper von den Eigenschaften des Azidalbumins. Die Kristalle des Hämözyanins sind gut ausgeprägt und zeigen schöne Doppelbrechung; ihre Zusammensetzung ist C 53,66 Proz., H 7,33 Proz., N 16,09 Proz., S 0,86 Proz., Cu 0,38 Proz.

Darstellung. Das Hämözyanin wird nach Henze²⁾ in der Weise dargestellt, daß man das Blut von *Octopus vulgaris* zuerst mit konzentrierter Ammoniumsulfatlösung bis zur beginnenden Trübung versetzt, die Trübung mit wenig Wasser wieder auflöst und mit verdünnter Essigsäure bis zum Eintreten einer neuen Fällung tropfenweise ver-

¹⁾ Fredericq, *Bullet. de l'academ. roy. de Belgique* (2) **47**, 4 (1879). — Kobert, Über Hämözyanin. *Sitzungsber. der Naturforschergesellschaft, Rostock* 1903, Nr. 5. — Ch. Dhéré, *Sur quelques propriétés d'oxyhémocyanine cristallisée. Société biolog.* **64**, 16 (1908).

²⁾ M. Henze, *Zur Kenntnis des Hämözyanins. Zeitschr. f. physiol. Chemie* **33**, 370 (1901); **43**, 290 (1904/05).

setzt. Nach $\frac{1}{2}$ stündigem Stehen filtriert man vom ausgeschiedenen kristallinen Niederschlag ab und versetzt das Filtrat mit Ammoniumsulfat, wodurch eine neue kristallinische Fällung eintritt.

9. Hämochromogen.

Spektrum. Eine alkalische Lösung von Hämochromogen ist schön rot und zeigt nach Stokes bei genügender Verdünnung zwei Absorptionsstreifen, von denen der dunklere mit seiner Mitte einer Wellenlänge $\lambda = 556,4$ entspricht und zwischen D und E liegt und der andere, breitere, aber weniger dunkle mit der Mitte $\lambda = 520,4$, die Fraunhoferschen Linien E und b einschließt. Auch bei starker Konzentration der Lösung zeigen sich keine anderen Streifen, und das blaue Licht bis G hin ist sehr wenig absorbiert. In saurer Lösung zeigt das Hämochromogen vier Streifen, die nach Jöckerholm von Hämochromogen und von den durch Einwirkung der Säure entstandenen Hämatoporphyrin herrühren sollen. Die dunkelste Stelle des Streifens im violetten Teil des Spektrums entspricht nach Gamgee $\lambda = 420,0$, nach Levin, Miethe und Stenger $\lambda = 385$.

Darstellung. Die Angabe Hoppe-Seylers, das Hämochromogen bei vollständiger Abwesenheit von Sauerstoff durch Einwirkung von Natronlauge bei 100° C in Form eines violettgrauen pulverigen Niederschlages erhalten zu haben, hat sich nicht bestätigt. Bei Zersetzung von Hämoglobin mit Säuren bei Luftabschluß erhält man das Hämochromogen von ein wenig Hämatoporphyrin verunreinigt. So erhielt Milroy eine saure Lösung des Hämochromogens, indem er durch eine alkoholische nur 0,4—0,8 Proz. Oxalsäure enthaltende Hämatinlösung Wasserstoff durchleitete und dann eine Spur Zinkstaub hinzufügte. Eine alkalische Hämochromogenlösung erhält man leicht durch Einwirkung reduzierender Mittel, wie z. B. Schwefelammonium, Hydrazinhydrat, ammoniakalische Ferrotartratlösung auf eine alkalische Hämatinlösung. Die alkalische Lösung zeigt schön kirschrote, die saure rote Farbe.

10. Hämatin $C_{34}H_{34}N_4FeO_5$.

Eigenschaften. Das Hämatin ist amorph, besteht aus einem Gemenge dunkelstahlblauer, metallisch glänzender Stücke, die sich zu einem fast schwarzen, spezifisch schweren Pulver zerreiben lassen. In Wasser, verdünnten Säuren, Alkohol, Äther, Chloroform ist es unlöslich, löst sich in warmem Eisessig, in angesäuertem Alkohol oder Äther und in Alkalien, selbst sehr verdünnten. Auch bei monatelanger Berührung mit konzentrierter Schwefelsäure löst es sich nicht vollständig auf. Die alkalischen Lösungen sind dichroitisch; in dickeren Schichten erscheinen sie im durchfallenden Lichte rot, in dünnen Schichten grünlich. Durch Kalk- und Barytwasser, wie auch von neutralen Erdalkalisalzen werden die alkalischen Lösungen in rotbraunen Flocken gefällt.

Spektrum. Die sauren und alkalischen Lösungen absorbieren am schwächsten den roten und am stärksten den violetten Teil des Spektrums. Die saure Lösung zeigt zwischen C und D einen recht scharfen Streifen, dessen Lage jedoch mit der Art des sauren Lösungsmittels etwas wechseln kann. Zwischen D und F findet sich ein zweiter, viel breiterer, weniger scharf begrenzter Streifen, der bei passender Verdünnung in zwei Streifen sich auflöst. Der eine, zwischen b und F, neben F gelegene, ist dunkler und breiter, der andere, neben E gelegene, ist heller und weniger breit. Ein sehr schmaler, schwacher Streifen erscheint bei gewisser Verdünnung zwischen D und E, dicht neben D, so daß vier Streifen vorhanden sind. Man sieht aber gewöhnlich recht deutlich nur den Streifen zwischen C und D und den breiten dunklen Streifen zwischen D und F. In alkalischer Lösung zeigt das Hämatin bis zu einer Konzentration von 0,015 g in 100 ccm bei einer Dicke der Flüssigkeitsschicht von 1 ccm einen schlecht begrenzten Absorptionsstreifen zwischen C und D, letzterem anliegend.

Darstellung. Nach Hoppe-Seyler gewinnt man Hämatin, indem man defibriniertes Blut mit Äther unter Zusatz von starker Essigsäure wiederholt schüttelt, die dunkelbraune ätherische Lösung abgießt, stehen läßt, bis sie sich absetzt, und filtriert. Nach einigem Stehen scheidet sich ein Niederschlag ab, der mit Äther, Alkohol und Wasser gewaschen wird.

v. Zeynek ¹⁾ stellt das Hämatin in der Weise dar, daß er eine wässerige Lösung von Oxyhämoglobin mit Pepsinsalzsäure verdaut, die Verdauungslösung mit 0,4prozentiger Salzsäure stark verdünnt, wodurch ein brauner, schlammartiger Niederschlag des Hämatins entsteht, der durch Verrühren mit 1prozentiger Salzsäure von beigemengten Schollen befreit und durch Dekantieren mit Wasser gereinigt wird.

Küster ²⁾ benutzt zur Darstellung des Hämatins Hämin als Ausgangsmaterial, indem er 5 g reines Hämin mit ein wenig Alkohol in einer Porzellanschale verreibt, mit einer Lösung von 1 g Ätznatron in 500 ccm eiskaltem Wasser in einen Kolben überspült und durch Schütteln löst. Hierauf filtriert er durch ein Kreppfilter in einen hohen Literzylinder, wäscht mit kaltem Wasser nach, fügt 100 ccm einer 1 volumprozentigen Schwefelsäure hinzu, schüttelt um, läßt das gefällte Hämatin absitzen und dekantiert zweimal mit kaltem Wasser. Den Niederschlag löst er wieder in reiner Natronlauge und fällt wieder mit derselben Schwefelsäure, wäscht den sehr voluminösen Hämatinschlamm durch wiederholtes Dekantieren aus, bringt ihn dann auf ein gehärtetes Filter, wäscht mit schwefelsäurefreiem Wasser nach, saugt ab und trocknet zunächst auf Filtrierpapier und dann im Vakuum oder bei gelinder Wärme.

11. Hämin $C_{34}H_{33}N_4FeClO_4$.

Eigenschaften. Die Häminkristalle oder Teichmannkristalle stellen ein seidenglänzendes, blauschwarzes Kristallpulver dar, das, unter dem Mikroskop gesehen, aus dünnen Blättchen und Säulchen des triklinen Systems, sowie Rosetten und sternförmigen Bildungen, auch rhombischen oder spulförmigen Kristallen besteht. Im auffallenden Lichte erscheinen sie schwach metallisch glänzend, im durchgehenden Lichte dunkelbraun und wenig durchsichtig. Die Kristalle sind unlöslich in Wasser, Äther und Chloroform, lösen sich in 70—80prozentigem Alkohol und in Eisessig beim Erwärmen. Das Hämin besitzt saure Eigenschaften, löst sich demnach in verdünnten Alkalien, auch in Karbonaten und organischen Basen auf, es enthält zwei durch Metalle noch vertretbare Wasserstoffatome. In verdünnten Säuren löst es sich nicht, durch konzentrierte Schwefelsäure wird es unter Entwicklung von Chlorwasserstoff gelöst, wobei sich Hämatoporphyrin bildet und das Eisen zum größten Teil herausgelöst wird.

Darstellung. Nach Schalfjew ³⁾ (Nencki und Zaleski) ⁴⁾

¹⁾ R. v. Zeynek, Über das Hämochromogen. Zeitschr. f. physiol. Chemie 25, 492 (1898).

²⁾ W. Küster, Über die nach verschiedenen Methoden hergestellten Hämine, das Dehydrochloridhämin und das Hämatin 40, 391 (1903/04).

³⁾ M. Schalfjew, Über die Darstellung des Hämins. Le Physiologiste russe 1, 15 (1898). Chemische Berichte 18, 232.

⁴⁾ M. Nencki und J. Zaleski, Untersuchungen über den Blutfarbstoff. Zeitschr. f. physiol. Chemie 30, 390 (1900).

fügt man einem Liter auf 90—95° C erwärmten, bei gewöhnlicher Temperatur mit pulverisiertem Kochsalz gesättigten Eisessig 200 ccm frisches defibriertes Blut in dünnem Strahle und unter fortwährendem Umschütteln hinzu und erwärmt auf 90° C. Die heiße Mischung gießt man durch ein Koliertuch in einen Rundkolben oder Becherglas, läßt 24 Stunden stehen, gießt hierauf die Essigsäure ab, wäscht den Kristallbrei durch Dekantieren mit Wasser, bringt ihn auf ein Filter, wäscht mit Wasser, dann mit 60—70prozentigem Alkohol nach und trocknet im Vakuum. Zum Umkristallisieren bringt man den Trockenrückstand in eine Lösung von 15 Volumen 96prozentigem Alkohol, 4 Volumen Wasser und 1 Volumen wässerigem Ammoniak vom spezifischen Gewicht 0,91 (für je 1 g Hämin 40—60 ccm Lösung), schüttelt gut um, bis sich die Hauptmenge gelöst hat, erwärmt das Filtrat auf 105—115° C, trägt in kleinen Portionen mit Kochsalz gesättigten Eisessig ein (4—6 Volumen Eisessig auf 1 Volumen der Lösung). Die ausgefallten Kristalle bringt man auf ein Filter, wäscht zuerst mit 2 Promille Salzsäure enthaltendem Wasser, dann mit verdünntem, 2 Promille Salzsäure enthaltendem Alkohol nach und trocknet im Vakuum. Die so erhaltenen Kristalle entsprechen der Formel:



Verfahren von Mörner¹⁾. Man verdünnt 1 Liter Blut mit 3 Liter Wasser, fügt 10 ccm 1prozentiger Schwefelsäure hinzu und erhitzt unter fortwährendem Umrühren bis zum lebhaften Aufwallen, bringt das Koagulum auf ein Koliertuch, läßt die Flüssigkeit ablaufen, wäscht gut nach, preßt scharf ab, verreibt den Rückstand mit etwa $\frac{1}{2}$ Liter Alkohol und preßt wieder scharf ab. Der getrocknete und fein zerriebene Preßkuchen wird in einer Porzellanschale mit 1750 ccm 90prozentigen Alkohols verrührt, mit 40 ccm konzentrierter Schwefelsäure unter Umrühren versetzt und zwei Stunden im kühlen Raum digeriert. Hierauf kolt man, preßt den Rückstand gut aus, filtriert die erhaltene dunkle Lösung in einen Rundkolben, erhitzt in einem Wasserbade gerade bis zum Sieden, worauf man ein Gemisch von 8 ccm 25prozentiger Salzsäure und 12 ccm 90prozentigen Alkohols unter Umschütteln zufügt. Es tritt hierbei starkes Schäumen auf, man gießt die Flüssigkeit sofort in ein Becherglas, das man 2 Tage in kaltem Wasser stehen läßt, damit sich das Hämin vollständig absetzen und der überstehende Alkohol klar abgegossen werden kann. Der Bodensatz wird nun auf ein Filter gebracht, nach Abfließen der weinrot gefärbten Mutterlauge mit 50prozentigem, 1 Proz. Salzsäure enthaltendem Alkohol nachgewaschen, die Kristalle auf Filtrierpapier abgepreßt und bei 70° C getrocknet.

Methode von Siewert²⁾. Die gesenkten und vom Serum befreiten Blutkörperchen werden mit dem drei- bis vierfachen Volumen

¹⁾ K. A. H. Mörner, Zur Darstellung und Zusammensetzung der Häminkristalle. Nordiskt Medic. Arch. Festband Nr. 1 und 26, 1 (1896).

²⁾ v. Siewert, Untersuchungen über das Hämin. Archiv f. experim. Pathol. 58, 386 (1908); s. auch Eppinger, Dissertation, München 1907.

Wasser verdünnt, durch ein Koliertuch gegossen und mit Essigsäure bis zur Koagulation erhitzt. Das Koagulum wird abgepreßt, an der Luft getrocknet, fein zerrieben, mit 95prozentigem Alkohol zu einem dünnen Brei verrieben und mit 3—5 ccm einer 10—15prozentigen Kalilauge für je 150—200 g Pulver versetzt, wodurch eine dickflüssige Lösung entsteht. Diese versetzt man tropfenweise und unter Umrühren mit konzentrierter Schwefelsäure, saugt den Eiweißniederschlag ab, verreibt mit Alkohol und filtriert wieder. Die vereinigten hämatinhaltigen Filtrate neutralisiert man mit Kalilauge, wodurch Hämatin ausfällt, das man durch vorsichtigen Zusatz von 1 volumprozentiger alkoholischer Schwefelsäure löst. Das dabei abgeschiedene Kaliumsulfat wird abfiltriert, das klare dunkelgefärbte Filtrat auf 70° C erhitzt, mit 4—5 ccm gesättigter alkoholischer Salzsäure auf je 1 Liter versetzt, die nach 24—48 Stunden abgeschiedenen Kristalle abfiltriert, mit Alkohol, Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Man erhält gut ausgebildete rhombische und sechseckige Kristalle.

Verfahren von Küster ¹⁾. Als Ausgangsmaterial zur Darstellung von reinem Hämin benutzt man am besten 5 g frisch gewonnenes Dehydrochlorhydrin oder Rohhämin. Man löst 1 g des Farbstoffes durch 5 Minuten langes Schütteln mit 1 g Chinin und 25 ccm Chloroform, filtriert durch ein Kreppfilter und wäscht mit Chloroform nach. Das Filtrat gießt man unter beständigem Umrühren in 150 ccm mit Kochsalz gesättigten, auf 105—110° C erhitzten Eisessig, wobei das Chloroform teilweise verdampft und läßt bis zum nächsten Tage bei kühler Temperatur stehen. Die ausgeschiedenen Häminkristalle filtriert man ab, wäscht sie mit etwas Salzsäure enthaltender Essigsäure nach, trocknet sie zunächst auf Fließpapier und dann im Vakuum über Kaliumhydroxyd.

Statt Chinin wendet Küster auch Pyridin an, von dem auf 1 g Farbstoff erst 7,5 ccm ausreichen; auch muß die Chloroformmenge auf 40 ccm vermehrt werden, ferner setzt er zum Eisessig vor dem Eintragen der Farbstofflösung $\frac{1}{2}$ —1 ccm konzentrierte Salzsäure hinzu.

Die Teichmannschen Häminkristalle erhält man im kleinen durch Kochen einiger Tropfen Blut im Reagenzglas mit überschüssigem Eisessig oder durch Eindampfen eines Tropfens Blut mit 10 bis 20 Tropfen Eisessig nach einmaligem Aufkochen über einer kleinen Flamme auf dem Wasserbade. Am besten trocknet man das Blut mit etwas Kochsalz ein oder zerreibt das bereits trockene Blut mit Kochsalz, bringt das Pulver auf ein Objektglas, befeuchtet mit Eisessig und legt das Deckgläschen auf. Dann setzt man mit einem Glasstabe am Rande des Deckgläschens mehr Eisessig zu, bis der Zwischenraum vollständig ausgefüllt ist, und erwärmt über sehr kleiner Flamme mit der Vorsicht, daß der Eisessig nicht ins Sieden kommt und mit dem Pulver an der Seite des Deckgläschens austritt. Falls nach dem

¹⁾ W. Küster, Über die Hämatine verschiedener Darstellungs- und Blutarten. Zeitschr. f. physiol. Chemie **29**, 187 (1900). — Über die nach verschiedenen Methoden hergestellten Hämine, das Dehydrochloridhämin und das Hämatin. Zeitschr. f. physiol. Chemie **40**, 408 (1904).

ersten Erwärmen beim Erkalten keine Kristalle sichtbar sind, so erwärmt man wieder, wenn nötig, unter Eisessigzusatz. Nach dem Erkalten beobachtet man in dem Präparate eine Menge von schwarzbraunen oder fast schwarzen Hämkristallen von wechselnden Formen (Hammarsten).

12. Dehydrochloridhämin ¹⁾



Eigenschaften. Es stellt eine fast schwarze, amorphe Masse dar, die leicht in allen Alkalien und Eisessig schwer in Äther und Chloroform, nicht löslich ist in Alkohol, Azeton und verdünnten Säuren. Beim Zerreiben mit konzentrierter Schwefelsäure wird der größte Teil des Eisens entfernt, ohne daß Lösung eintritt; gießt man diese Masse in viel kaltes Wasser, so löst dieses gar keinen oder nur sehr wenig Farbstoff (Hämatoporphyrin), das Dehydrochloridhämin verhält sich somit wie das Hämatin, während Hämin in konzentrierter Schwefelsäure löslich ist.

Darstellung. Man verreibt 5 g Rohhämin in einer Schale mit frisch destilliertem Anilin, bringt die Masse mittels Anilin in eine weithalsige Flasche, schüttelt 2 Stunden lang auf der Schüttelmaschine, filtriert und wäscht den Niederschlag mit Anilin nach, wodurch die Elemente des Chlorwasserstoffs abgespalten werden und Dehydrochloridhämin resultiert. Zur Entfernung der auf dem Filter gebliebenen Verunreinigungen extrahiert man längere Zeit mit Äther, gießt das Filtrat in ganz dünnem Strahle in 2 Liter 20prozentiger, in Bewegung erhaltener Essigsäure, wobei sich das Dehydrochloridhämin in harzigen Klumpen ausscheidet, die bald bröcklig werden, und läßt einen Tag stehen. Nun gießt man die Flüssigkeit durch ein Filter ab, bringt den Farbstoff in eine Schale, verreibt ihn wieder mit 20prozentiger Essigsäure, filtriert und wäscht mit Essigsäure nach. Das zunächst auf Filtrierpapier und dann im Vakuum getrocknete Dehydrochloridhämin wird zur Entfernung der letzten hartnäckig anhaftenden Anilinreste 2—3 Tage im Soxhletapparat mit Äther extrahiert, bis der Rückstand an verdünnte Essigsäure kein Anilin mehr abgibt (beim Extrahieren geht ein Teil des Farbstoffes mit weinroter Farbe in Lösung und scheidet sich nach Beendigung der Extraktion im Siedekolben in rotgelben Nadeln, die ein eisenfreies Derivat des Hämins darstellen und unter der Einwirkung des Anilins entstehen).

13. Hämatoporphyrin



Eigenschaften. Der aus dem salzsauren Hämatoporphyrin in salzsaurer Lösung auf Zusatz von Natronlauge bis zur neutralen Reaktion und darauf folgendes Versetzen mit Natriumazetat sich ausscheidende Farbstoff stellt amorphe, braune Flocken dar, die in Äther, Chloroform und Amylalkohol nur wenig, in Äthylalkohol, Alkalien und verdünnten Mineralsäuren dagegen leicht löslich sind. Die Verbindung des Hämatoporphyrins mit Salzsäure kristallisiert in langen, braunroten Nadeln, die Verbindung mit Natrium bildet kleine Drusen

¹⁾ W. Küster, Über die nach verschiedenen Methoden hergestellten Hämine, das Dehydrochloridhämin und das Hämatin. Zeitschr. f. physiol. Chemie **40**, 408 (1904). — W. Küster und K. Fuchs, Über ein neues kristallisiertes Derivat des Hämins. Chemische Berichte **40**, 2021 (1907).

von braunen Kristallen. Die sauren, alkoholischen Lösungen haben eine prachtvolle Purpurfarbe, die auf Zusatz von größeren Säuremengen violettblau wird; die alkalischen Lösungen haben eine schöne rote Farbe.

Spektrum. Die sauren alkoholischen Lösungen zeigen zwei Absorptionsstreifen, von denen der schwächere und weniger breite zwischen C und D dicht an D gelegen ist und die dunkelste Stelle nach Levin, Miethe und Stenger¹⁾ $\lambda = 593$ hat, der zweite viel dunklere, schärfere und breitere, dessen dunkelste Stelle $\lambda = 550$ entspricht, liegt etwa in der Mitte zwischen D und E und hat rotwärts eine schattenhafte Fortsetzung, die als ein dritter Streifen zwischen den beiden anderen aufgefaßt werden kann. Die alkalischen Lösungen zeichnen sich durch vier Absorptionsstreifen aus, von denen der erste zwischen C und D liegt, der zweite und dritte zwischen D und E, wobei der dritte näher E liegt, und der vierte, breite und dunkle Streifen zwischen b und F. Auf Zusatz von alkalischer Chlorzinklösung erhält man ein Spektrum mit nur zwei Streifen, den einen um D herum und den anderen zwischen D und E. Beim Schütteln einer sauren Lösung mit Chloroform geht ein Teil des Hämatoporphyrins in Chloroform über, und die Chloroformlösung zeigt oft ein fünfbandiges Spektrum mit zwei Streifen zwischen C und D. Die Lage der Hämatoporphyrinstreifen im Spektrum wechselt je nach der Darstellungsweise so, daß sie nicht immer denselben Wellenlängen entspricht.

Darstellung²⁾. Man bringt in einen 300 ccm fassenden, mit 75 ccm bei 10° C mit Bromwasserstoff gesättigtem Eisessig beschickten Kolben 5 g bei 100° C getrocknetes Hämatin und läßt unter öfterem Umschütteln bei Zimmertemperatur 3—4 Tage stehen, bis alles Hämin gelöst und die Lösung die schöne rote Farbe des Hämatoporphyrins angenommen hat. Den Kolbeninhalt gießt man in $\frac{1}{2}$ Liter destilliertes Wasser, wobei ein Niederschlag entsteht, der nach einigen Stunden abfiltriert und so lange mit Natronlauge versetzt wird, bis aller Bromwasserstoff neutralisiert ist, wobei der in verdünnter Essigsäure unlösliche Farbstoff fast vollständig ausfällt, und läßt absitzen. Hierauf wäscht man den Niederschlag durch Dekantieren bromfrei, d. h. bis das Filtrat mit Silbernitrat keinen Niederschlag mehr gibt, und löst ihn in reiner verdünnter Natronlauge, um geringe Mengen beigemengten Eisensalzes zu entfernen. Das Filtrat wird wieder mit Essigsäure gefällt, das ausgefällte Hämatoporphyrin auf ein gehärtetes Filter gebracht, ausgewaschen, gut abgesaugt, mit wenig Wasser in einer Schale zum dicken Brei verrieben und mit kleinen Portionen Salzsäure unter Umrühren und Erwärmen auf 75° C so lange versetzt, bis der Farbstoff in Lösung geht. Hierauf filtriert man von dem harzigen Rückstand ab, versetzt das Filtrat mit $\frac{1}{10}$ Volumen 40prozentiger Salzsäure, und sollte jetzt wieder ein harziger Niederschlag entstehen, so filtriert man von neuem ab und läßt das Filtrat im Vakuum über Schwefelsäure 2—3 Tage stehen, worauf man die ausgeschiedenen Kristalle absaugt und mit 10prozentiger Salzsäure nachwäscht. Durch Lösung in 0,7prozentiger, auf 75° C erhitzter Salzsäure und Zusatz

¹⁾ L. Levin, A. Miethe und E. Stenger, Über die durch Photographie nachweisbaren spektralen Eigenschaften der Blutfarbstoffe und anderer Farbstoffe des tierischen Organismus. Pflügers Archiv **118**, 80 (1907).

²⁾ M. Nencki und N. Sieber, Über das Hämatoporphyrin. Archiv f. experim. Pathol. und Pharmak. **24**, 430 (1888). Monatshefte f. Chemie **9**, 115; **10**, 568. — M. Nencki, Omnia opera II, 74 und 754. — M. Nencki und J. Zaleski, Untersuchungen über den Blutfarbstoff. Zeitschr. f. physiol. Chemie **30**, 390 (1900).

von $\frac{1}{10}$ Volumen konzentrierter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 wird das salzsaure Hämatorporphyrin rein erhalten (Zaleski)¹⁾.

14. Mesoporphyrin



Eigenschaften. Das Mesoporphyrin scheidet sich aus essigsaurer Lösung auf Zusatz von Alkohol als eine rote kristallinische Substanz, die in Wasser unlöslich, in Alkohol und Äther wenig, in Alkalien und Ammoniak leicht, schwerer und nur beim Erwärmen in Eisessig und Mineralsäuren löslich ist. Das durch Fällen der alkalischen Lösung des salzsauren Salzes mit einem Überschuß von Essigsäure erhaltene amorphe Mesoporphyrin ist in starker Essigsäure, in Alkohol und in Gemischen von Alkohol und Essigsäure leicht löslich.

Spektrum. Das Spektrum des Mesoporphyrins ist dem des Hämatorporphyrins sehr ähnlich, nur mit dem Unterschiede, daß beim Mesoporphyrin eine unbedeutende Verschiebung sämtlicher Streifen nach dem violetten Teile stattfindet. Das salzsaure Salz zeigt in salzsaurer Lösung drei Streifen zwischen D und E, deren dunkelste Stellen $\lambda = 589, 567$ und 546 entsprechen, ferner einen allmählich auftretenden feinen, schwer sichtbaren, im Rot mit $\lambda = 608$ und einen im Violett mit $\lambda = 399$ (Levin, Miethe und Stenger)²⁾.

Darstellung. Zaleski löst 2 g Hämin in 30 ccm Eisessig und 6 ccm Jodwasserstoffsäure durch Erwärmen im stark kochenden Wasserbade unter öfterem Umschütteln des Kolbens bis zur vollständigen Lösung des Farbstoffes, was etwa $\frac{1}{4}$ Stunde in Anspruch nimmt. Hierauf bringt man den Kolben in ein mäßig erwärmtes Wasserbad und fügt unter öfterem Schütteln 3 ccm Wasser und 2—25 g Phosphoniumjodid in kleinen Portionen hinzu, gießt hierauf den Inhalt des Kolbens in 2 Volumen Wasser ein und versetzt mit 60 ccm einer 20 prozentigen Natronlauge, wodurch der Farbstoff ausfällt. Den Niederschlag bringt man sofort auf ein Filter (beim Stehen zersetzt es sich und kristallisiert dann sehr schwer oder gar nicht mehr), saugt ab, wäscht ihn zweimal mit Wasser nach, spült ihn in einen Kolben über, fügt $\frac{1}{2}$ Liter 1 prozentiger Salzsäure hinzu und erhitzt bis zum Kochen. Hierauf setzt man noch 20 ccm einer 40 prozentigen Salzsäure zu, filtriert und fügt nach dem Erkalten noch 50 ccm starker Salzsäure hinzu und läßt das salzsaure Mesoporphyrin in einer Schale im Vakuum auskristallisieren.

H. Galle.

Das Sekret der Leber, das regelmäßig einen niedrigeren Gehalt an festen Stoffen als die Blasengalle hat, ist dünnflüssig und klar, während die in der Blase angesammelte Galle, infolge einer Resorption

¹⁾ J. Zaleski, Untersuchungen über das Mesoporphyrin. Zeitschr. f. physiol. Chemie **37**, 54 (1902).

²⁾ L. Levin, A. Miethe und E. Stenger, Über die durch Photographie nachweisbaren spektralen Eigenschaften der Blutfarbstoffe und anderer Farbstoffe des tierischen Organismus. Pflügers Archiv **118**, 80 (1907). — M. Nencki und J. Zaleski, Über die Reduktionsprodukte des Hämins durch Jodwasserstoff und Jodphosphonium. Chemische Berichte **34**, 997 (1901). — M. Nencki, Omnia opera II, 792. — J. Zaleski, Untersuchungen über das Mesoporphyrin. Zeitschr. f. physiol. Chemie **37**, 59 (1902). — J. Merunowicz und J. Zaleski, Untersuchungen über Hämine. Extrait du Bulletin de l'Académie des Sciences de Cracovic **1907**. 640.

von Wasser und der Beimengung von „Schleim“, mehr zähe und dickflüssig und durch Beimengung von Zellen, Pigmentkalk und dergleichen trübe wird. Die Reaktion ist alkalisch gegen Lackmus. Die Farbe ist bei verschiedenen Tieren wechselnd, goldgelb, gelbbraun, olivenbraun, braungrün, grasgrün oder blaugrün; die Menschengalle ist gewöhnlich goldgelb oder gelb mit einem Stich ins Bräunliche. Der Geschmack der Galle ist bei verschiedenen Tieren ein verschiedener; die Menschen- und Rindergalle schmecken bitter mit einem süßlichen Nachgeschmack.

Gallensäuren. Die verschiedenen Gallensäuren kommen in der Galle als Alkalisalze und überwiegend als Natriumverbindungen vor. Die Galle einiger Tiere enthält nur Glykocholsäure, die anderer nur Taurocholsäure und andere ein Gemenge von beiden, sowie noch andere ähnliche Säuren (s. u).

Die gallensauren Alkalien sind in Wasser und Alkohol löslich, in Äther unlöslich. Aus der alkoholischen Lösung werden sie durch Äther in Form von Rosetten oder Ballen von feinen Nadeln oder vierseitigen Prismen kristallisiert erhalten (Plattners kristallisierte Galle). Die Gallensäuren und deren Salze sind optisch aktiv und rechtsdrehend.

Nachweis. Pettenkofer'sche Gallensäureprobe. Man löst in einer kleinen Porzellanschale eine ganz kleine Menge Galle direkt in wenig konzentrierter Schwefelsäure und erwärmt vorsichtig, so daß die Temperatur nicht über 70° C steigt. Hierauf setzt man unter Umrühren mit einem Glasstabe eine 10prozentige Rohrzuckerlösung tropfenweise zu, wobei man in Gegenwart von Galle eine prachtvolle rote Farbe erhält, die bei Zimmertemperatur nicht verschwindet, sondern im Laufe des Tages mehr blauviolett wird. Die rote Flüssigkeit zeigt in dem Spektrum zwei Absorptionsstreifen, den einen bei F und den anderen zwischen D und E. Die Reaktion mißglückt jedoch bei zu starkem Erwärmen und bei einer zu großen Menge Zucker, sowie bei Gegenwart von schwefeliger Säure oder der niedrigen Oxydationsstufen des Stickstoffs. Da Eiweiß, Ölsäure, Amylalkohol und mehrere andere Stoffe diese Reaktion geben, so entscheidet in zweifelhaften Fällen die spektroskopische Untersuchung der roten Lösung.

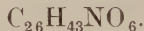
Da das Prinzip dieser Reaktion auf der Bildung von Furfurol aus Rohrzucker beruht, empfehlen Mylius und v. Udransky ¹⁾ direkt eine Furfurollösung anzuwenden, indem sie die durch Tierkohle gereinigte Galle in Alkohol lösen, 1 ccm dieser Lösung mit 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure und einem Tropfen Furfurollösung (1 Promille) versetzen und abkühlen, wenn nötig, damit die Flüssigkeit sich nicht zu sehr erwärmt. Es läßt sich auf solche Weise $\frac{1}{20}$ — $\frac{1}{30}$ mg Cholsäure nachweisen.

Nachweis der Gallensäuren in tierischen Flüssigkeiten. Um die Gallensäuren rein zu erhalten, muß in der zu untersuchenden Flüssigkeit zuerst alles Eiweiß und Fett entfernt werden. Zu diesem Zweck macht man die Flüssigkeit erst neutral, fügt einen so großen Überschuß an Alkohol hinzu, daß das Gemisch mindestens 85 Volumprozent wasserfreien Alkohol enthält, filtriert, extrahiert das ausgeschiedene Eiweiß wieder mit Alkohol, destilliert den Alkohol der vereinigten Auszüge ab und dampft zur Trockne ein. Den Rückstand erschöpft man vollständig mit Alkohol, filtriert, erwärmt das Filtrat, bis der Alkohol vollständig verdunstet, löst den Rückstand in Wasser und versetzt die Lösung mit Bleiessig und Ammoniak. Den ausgefallenen Niederschlag wäscht man aus, löst ihn in kochendem Alkohol, filtriert warm, setzt einige Tropfen Sodalösung zu, verdampft zur Trockne, extrahiert den Rückstand mit absolutem Alkohol,

¹⁾ F. Mylius, Über die Cholsäure. Chemische Berichte **19**, 369 (1886). Notiz über die Darstellung und Zusammensetzung der Cholsäure. Zeitschr. f. physiologische Chemie **12**, 262 (1888). — Udransky, Ebenda.

filtriert und setzt Äther im Überschuß zu. Den Niederschlag verwendet man zur Pettenkofer'schen Probe.

1. Glykocholsäure



Eigenschaften. Die Glykocholsäure kristallisiert in feinen, farblosen Nadeln oder Prismen, die bei 138—140° C schmelzen, sich in 300 Teilen kalten und 120 Teilen heißen Wassers, sehr leicht in starkem Alkohol, schwer im Äther lösen. Auf Zusatz von Mineralsäure fallen sie aus der wässerigen Lösung aus. Die spezifische Drehung der alkoholischen Lösung ist nach Hoppe-Seyler ¹⁾ $[\alpha]_{\text{D}} = +29,0^\circ$, die des Natronsalzes $[\alpha]_{\text{D}} = +25,7^\circ$.

Nachweis. Löslichkeitsverhältnisse, Drehungsvermögen, Pettenkofer'sche Reaktion, Schwerlöslichkeit in Wasser. Unterscheidet sich von der Cholsäure durch Ausbleiben der Jodreaktion, von der Taurocholsäure durch Fehlen des Schwefels.

Darstellung. Gorup-Besanez ²⁾ empfiehlt, Ochsen-galle fast bis zur Trockne auf dem Wasserbade einzudampfen, den Rückstand mit Alkohol zu extrahieren, diesen zu verdunsten, den Rückstand mit etwas Wasser und Kalkmilch zu versetzen und leicht zu erwärmen. Das schwach gelbe Filtrat wird nach dem Erkalten vorsichtig mit verdünnter Schwefelsäure (kein Überschuß) bis zur bleibenden Trübung versetzt und stehen gelassen, wobei die Flüssigkeit in wenigen Stunden zu einem Kristallbrei erstarrt, den man dann abfiltriert, wieder in Kalkwasser löst und mit verdünnter Schwefelsäure bis zur bleibenden Trübung versetzt. Nach einigen Stunden scheidet sich die Glykocholsäure in blendend weißen Nadeln aus.

Verfahren nach Hüfner ³⁾ Man überschichtet frische Galle in einem engen Zylinder mit etwas Äther und setzt so viel rauchende Salzsäure hinzu, daß auf 40 ccm Galle 2 ccm Säure kommt, wobei bald eine milchige Trübung auftritt, die oft schon in wenigen Minuten kristallinisch erstarrt. Sobald die Kristallisation zu Ende ist, gießt man den Äther ab, rührt die Masse mit Wasser an, schüttelt die Masse gut durch, bringt sie auf ein glattes Filter, wäscht so lange mit kaltem Wasser nach, bis das Filtrat farblos abläuft. Die so erhaltene dicht verfilzte, graugrünliche Kristallmasse wird in heißem Wasser gelöst und stehen gelassen, wobei sich die Glykocholsäure in weißen Kristallnadeln ausscheidet.

Verfahren von Hammarsten ⁴⁾. Die Reindarstellung der Glykocholsäuren geschieht in der Weise, daß man die mit Alkohol vom Schleim befreite Galle nach Verdunstung des Alkohols mit Bleizuckerlösung fällt, den Niederschlag durch Kochen mit Sodalösung zersetzt, zur Trockne eindampft, den Rückstand mit Alkohol extrahiert, wobei die Alkaliglykocholate in Lösung gehen. Die alkoholische Lösung wird verdunstet, der Rückstand in Wasser gelöst, die Lösung

¹⁾ J. Hoppe-Seyler, Über die Zirkumpolarisationsverhältnisse der Gallensäure. Journ. f. prakt. Chemie **89**, 257 (1863).

²⁾ E. v. Gorup-Besanez, Eine vorteilhafte Darstellungsweise der Glykocholsäure. Liebigs Annalen **157**, 286 (1871).

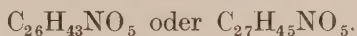
³⁾ H. Hüfner, Schnelle Darstellung von Glykocholsäure. Journ. f. prakt. Chemie **118**, 267 (1874).

⁴⁾ O. Hammarsten, Lehrbuch der physiologischen Chemie.

mit Tierkohle entfärbt, mit Äther im Überschuß versetzt und die Glykocholsäure durch Zusatz einer verdünnten Mineralsäure aus der Lösung gefällt. Das durch sorgfältiges Auswaschen mit Wasser vollständig von Mineralsäure befreite Gemenge der zwei Glykocholsäuren wird mit Wasser ausgekocht, wobei die Glykocholsäure gelöst wird und aus dem Filtrate beim Erkalten auskristallisiert. Die Glykcholeinsäure bleibt neben der umgewandelten Glykocholsäure (Paraglykocholsäure) ungelöst zurück und wird in weiter unten angegebener Weise isoliert.

Plattners kristallisierte Galle. Man dampft Rindergalle zum dicken Sirup ein, extrahiert diesen mit Alkohol, kocht die Lösung mit Tierkohle, destilliert den Alkohol ab und versetzt die eingeeengte alkoholische Lösung mit überschüssigem Äther, wobei das glyko- und taurocholsaure Natrium ausfallen. Der Niederschlag, der sich nach Stunden bis Tagen in schöne seidenglänzende Kristallbüschel, die sogenannte Plattners kristallisierte Galle, verwandelt, wird in einer ausreichenden Menge Wasser gelöst, die Lösung mit Äther und dann mit so viel verdünnter Schwefelsäure versetzt, bis eine starke bleibende Trübung entstanden ist. Nach einigen Stunden erstarrt die Flüssigkeit zu einem Brei feiner, seidenglänzender Nadeln, die auf einem Filter gesammelt, mit Wasser gewaschen, in einer genügenden Menge Alkohol gelöst und mit sehr viel Äther versetzt werden, wodurch man eine aus farblosen, dünnen, langen, sehr schön glänzenden Nadeln bestehende Fällung erhält.

2. Glykcholeinsäure



Eigenschaften. Die Glykcholeinsäure, die zweite, aus der Rindergalle von Wahlgren isolierte Glykocholsäure, kristallisiert, wie diese in Büscheln von feinen Nadeln, wird aber auch in kürzeren dicken Prismen erhalten, ist in Wasser schwerer löslich und schmilzt bei 175—176° C. Die Lösungen der Alkalisalze werden von den Salzen der Schwer- und Erdalkalimetalle gefällt. Bei der hydrolytischen Spaltung liefert sie Glykokoll und Choleinsäure. Sie kommt auch in der Menschengalle und in der Galle des Moschusochsen vor.

Darstellung. Das bei der Glykocholsäuredarstellung zurückgebliebene, aus Glykcholeinsäure, Paraglykocholsäure und etwas Glykocholsäure bestehende Gemenge löst man in Wasser in Gegenwart von Natriumkarbonat, filtriert, dampft zur Trockne ein, extrahiert den Rückstand mit Alkohol, filtriert vom ungelösten Karbonat ab, verdunstet den Alkohol und löst den Rückstand in Wasser. Nun versetzt man die Lösung mit einer 15—20prozentigen Chlorbariumlösung bis zur bleibenden Trübung. Ruft nach 24 Stunden ein Zusatz von Bariumchlorid keine Trübung mehr hervor, so filtriert man vom Niederschlage ab, kocht diesen mit Wasser und filtriert von den Barytseifen ab und fällt die Filtrate mit Salzsäure. Der Niederschlag wird durch Kochen mit Wasser und Natriumkarbonat in das Natronsalz übergeführt und mit Tierkohle entfärbt. Die entfärbte Lösung wird eingedampft, der Rückstand mit Alkohol extrahiert, das Filtrat eingedampft und der Rückstand in so viel Wasser gelöst, daß die Lösung höchstens 1prozentig ist und versetzt mit Äther und Salzsäure bis etwa 1 Proz., schüttelt um und läßt stehen. Die auskristallisierte Masse wird mit Wasser ausgewaschen, durch Kochen mit Wasser von der Glykocholsäure befreit, in Wasser unter Zusatz von etwas

Ammoniak gelöst und mit Chlorbarium gefällt. Das Bariumsalz wird nun in das Alkalisalz übergeführt und aus dessen 1prozentiger wässriger Lösung durch Zusatz von Äther und Salzsäure gefällt. Die so erhaltene Glykocholeinsäure wird durch vier- bis fünfmalige Umwandlung in das Bariumsalz fast vollständig rein gewonnen (Wahlgren)¹⁾.

3. Taurocholsäure



Eigenschaften. Die Taurocholsäure kristallisiert in feinen, leicht zerfließlichen Nadeln, löst sich zum Unterschied von Glykocholsäure leicht in Wasser und kann ihrerseits auch die schwerlösliche Glykocholsäure in Lösung halten, deshalb kann ein Gemenge von Glykocholat mit einer genügenden Menge von Taurocholat nicht von einer verdünnten Säure getrennt werden. Die Taurocholsäure ist in Alkohol leicht löslich, in Äther unlöslich; ihre Lösungen haben einen bittersüßlichen Geschmack. Die Lösungen der Alkalisalze werden durch Kupfersulfat, Silbernitrat oder Bleizucker nicht gefällt, dagegen erzeugt Bleiessig einen in kochendem Alkohol löslichen Niederschlag. Die Säure dreht rechts, und zwar ist für die alkoholische Lösung des Natronsalzes $[\alpha]_D = +21,5^\circ$.

Nachweis. Zum Nachweis benutzt man die Löslichkeitsverhältnisse, den Geschmack, das Drehungsvermögen, den Schwefelgehalt, den positiven Ausfall der Pettenkoferschen Probe.

Darstellung. Man dampft Hundegalle bis zur Trockne ein, extrahiert den Rückstand mit Alkohol, kocht die alkoholische Lösung mit Alkohol aus, dampft das Filtrat ein, nimmt den Rückstand mit starkem Alkohol auf, engt die filtrierte Lösung ein, schüttelt den Rückstand mit überschüssigem Äther aus und läßt im verschlossenen Gefäß stehen, bis der zuerst amorphe Niederschlag des taurocholsauren Natriums kristallinisch geworden ist. Nun gießt man den Äther ab, löst die Kristalle in Wasser, versetzt die Lösung mit Bleiessig und etwas Ammoniak, wodurch ein Niederschlag entsteht, den man abfiltriert, mit starkem Alkohol auskocht, heiß filtrierte und in das Filtrat Schwefelwasserstoff einleitet. Die vom Bleisulfid abfiltrierte Lösung wird auf ein kleines Volumen eingedampft und mit einem großen Überschuß von absolutem Äther versetzt, wobei sich ein sirupartiger Niederschlag ausscheidet, der beim Stehen größtenteils kristallisiert.

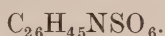
Methode von Hammarsten²⁾. Die frische Hundegalle wird durch Fällen mit Alkohol vom Schleim befreit, bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand in starkem Alkohol gelöst, die Lösung mit einem Überschuß von Äther unter Umschütteln versetzt. Die entstandene, nicht stark gefärbte flockige Fällung der Gallensäuren wird abfiltriert, abgepreßt und in so viel Wasser gelöst, daß die Lösung 2 bis 5prozentig ist. Diese Lösung versetzt man mit einer 5prozentigen Eisenchloridlösung, solange noch ein Niederschlag entsteht. Der abfiltrierte Niederschlag enthält neben etwas Farbstoff hauptsächlich Taurocholeinsäure, zu deren Darstellung er auch verwendet wird.

¹⁾ V. Wahlgren, Über Glykocholsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie **36**, 556 (1902).

²⁾ O. Hammarsten, Über die Darstellung kristallisierter Taurocholsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie **43**, 140 (1904/05).

Das saure Filtrat wird mit Sodalösung oder verdünnter Natronlauge genau abgestumpft, aber nicht neutral gemacht und die dadurch entstandene Eisenfällung abfiltriert. Das Filtrat wird abermals mit Eisenchlorid versetzt, mit etwas Wasser verdünnt und, ohne zu filtrieren, in der angegebenen Weise mit Soda versetzt. Der nun abfiltrierte Niederschlag wird mit den übrigen Eisenniederschlägen versetzt und zur Darstellung der Taurocholeinsäure verwendet. Das an Taurocholeinsäure arme Filtrat wird mit Soda schwach alkalisch gemacht, das Eisenhydroxyd abfiltriert und das neue Filtrat bei Zimmertemperatur mit Kochsalz gesättigt, wobei sich das Taurocholat als grobflockige Fällung ausscheidet, die abfiltriert, ausgepreßt, in Wasser gelöst und durch nochmaliges Aussalzen rein weiß erhalten wird. Das durch wiederholte Alkoholbehandlung vom Kochsalz befreite Taurocholat wird in möglichst wenig absolutem Alkohol gelöst, die Lösung mit schwefelsäurehaltigem Alkohol bis zu 2—3 Proz. Säure versetzt, das hierbei ausfallende Sulfat bzw. Kochsalz wird abfiltriert und das Filtrat mit überschüssigem Äther gefällt. Die amorph ausgeschiedene Säure wird in wenig Alkohol gelöst, die filtrierte Lösung mit wenig Wasser versetzt und Äther bis zur bleibenden Trübung hinzugefügt, wobei sich die Säure bald in Nadeln oder Prismen und Drusen von solchen ausscheidet. Hört die Kristallisation auf, so fügt man wieder Äther bis zur Trübung hinzu und verfährt so weiter, bis keine Kristalle mehr entstehen.

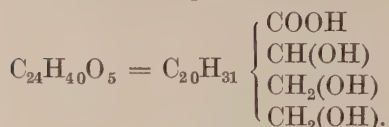
4. Taurocholeinsäure



Eigenschaften. Die Säure löst sich leicht in Wasser und Alkohol, ist unlöslich in Äther, Chloroform, Azeton und Benzol. Geschmack intensiv widrig bitter. Die Alkalisalze werden in wässriger Lösung von Eisenchlorid gefällt.

Darstellung. Die bei der Darstellung der Taurocholsäure erhaltenen Eisenfällungen zerlegt man durch Kochen mit Sodalösung, filtriert, dampft zur Trockne ein, behandelt den Rückstand mit Alkohol, wobei ein beträchtlicher Teil des Farbstoffs ungelöst bleibt. Das mit Tierkohle entfärbte alkoholische Filtrat dampft man zur Trockne ein, behandelt den Rückstand wie bei der Taurocholsäure mit schwefelsäurehaltigem Alkohol und fällt das Filtrat mit überschüssigem Äther. Scheiden sich keine Kristalle von Taurocholsäure mehr aus, sondern nur eine sirup- oder harzähnliche Bodenschicht, gießt man den Alkohol-Äther ab, führt die Säure in das Natriumsalz über und fällt die wässrige Lösung des letzteren mit Eisenchlorid, wobei die Taurocholeinsäure ausfällt, während die Spuren der Taurocholsäure in Lösung bleiben. Aus der Eisenfällung stellt man wieder das Natriumsalz dar, löst es in absolutem Alkohol, zerlegt es mit säurehaltigem Alkohol und fällt das Filtrat mit überschüssigem Äther, wobei die Säure sich als sirup- oder honigähnliche Schicht zu Boden setzt; es ist noch nicht in Kristallen erhalten worden.

5. Cholsäure resp. Cholalsäure



Eigenschaften. Cholsäure kristallisiert mit 1 Molekül Kristallalkohol aus Alkohol in großen rhombischen Tetraedern oder Oktaedern und aus Äther in rhombischen Tafeln und Prismen mit 1 Molekül Wasser, die an der Luft bald undurchsichtig und porzellanweiß werden. Sie ist sehr schwer löslich in Wasser — in 4000 Teilen kaltem und 750 Teilen kochendem — und in Äther, leicht in Alkohol, Azeton und Eisessig. Die Kristalle verlieren den Kristallalkohol erst bei langdauerndem Erhitzen auf 100–120° C; die wasser- und alkoholfreie Säure schmilzt bei 195° C, mit Jod bildet sie eine charakteristische blaue Verbindung. Die Cholsäure und alle Verbindungen drehen rechts; ihr spezifisches Drehungsvermögen ist nach Vahlen¹⁾ für die tetraedrische in alkoholischer Lösung $[\alpha]_{\text{D}} = +31,55^\circ$, für die kristallwasserfreie in alkoholischer Lösung $[\alpha]_{\text{D}} = +37,02^\circ$, für das Kalisalz in 3prozentiger wässriger Lösung $[\alpha]_{\text{D}} = +27,6^\circ$, für das Natronsalz in 4prozentiger wässriger Lösung $[\alpha]_{\text{D}} = +27,6^\circ$.

Nachweis. Zum Nachweis der Cholsäure dienen außer der Kristallform und des Drehungsvermögens die grüne Fluoreszenz beim Auflösen in konzentrierter Lösung, die Pettenkofer'sche Reaktion (s. S. 199) und die ausschließlich für sie charakteristische Jodreaktion von Mylius. Versetzt man eine Lösung von 0,02 g kristallisierter Cholsäure in 0,5 g Alkohol mit 1 ccm einer $\frac{1}{10}$ Normaljodlösung und verdünnt das Gemisch allmählich mit Wasser, so erstarrt die anfangs braune Flüssigkeit plötzlich zu einem dunklen Brei mikroskopischer Nadeln, die im auffallenden Lichte gelben Metallglanz und im durchfallenden Lichte blaue Färbung zeigen.

Darstellung. Das zur Darstellung der Cholsäure von Stecker und Mylius²⁾ angegebene Verfahren wurde später von Latschinow, Lassar-Cohn³⁾, Vahlen, Pregl und Langheld⁴⁾ weiter ausgearbeitet und verbessert.

Man kocht Rindergalle mit dem $\frac{1}{5}$ Teil ihres Gewichtes 30prozentiger Kalilauge 24 Stunden lang unter Erneuerung des verdampften Wassers, sättigt dann mit Kohlensäure, dampft die Flüssigkeit bis zum dicken Sirup ein, den man noch heiß in Alkohol gießt, gut durchschüttelt und in einen Scheidetrichter bringt. Man läßt nach einigem Stehen die hauptsächlich Kaliumkarbonat enthaltende Lösung von der alkoholischen ab, schüttelt die wässrige Lösung mit wenig Alkohol nochmals durch, verdünnt die vereinigten, cholsaures Kali neben fettsaurem und choleinsaurem Kali enthaltenden alkoholischen Lösungen

¹⁾ E. Vahlen, Die spezifische Rotation der Cholsäure, Choleinsäure und Desoxycholsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie **21**, 253 (1895/96).

²⁾ A. Strecker, Untersuchungen der Ochsgalle. Liebigs Annalen **67**, 1 (1848). — J. Mylius, Über die Cholsäure. Chemische Berichte **19**, 369 (1886). Notiz über die Darstellung und Zusammensetzung der Cholsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie **12**, 262 (1888).

³⁾ P. Latschinow, Über die Cholsäure, die feste Fettsäuren enthält. Chemische Berichte **13**, 1911 (1880). — Lassar-Cohn, Zur Kenntnis der Säuren der Rindergalle. Zeitschr. f. physiol. Chemie **17**, 607 (1893). Die Säuren der menschlichen Galle. Ebenda **19**, 563 (1894).

⁴⁾ F. Pregl, Über die Darstellung und einige Reaktionen der Cholsäure. Pflügers Archiv **71**, 303 (1898). Über die Isolierung von Desoxycholsäure und Cholsäure aus frischer Rindergalle. Sitzungsber. der Wiener Akademie III, II b, 1024 (1902). — K. Langheld, Über die Bestandteile der Rindergalle. Chemische Berichte **41**, 378 (1908).

mit so viel Wasser, daß die Lösung 20 Proz. Alkohol enthält, versetzt dann mit verdünnter Chlorbariumlösung, solange ein Niederschlag entsteht, und filtriert. Das Filtrat versetzt man mit Salzsäure bis zur sauren Reaktion, wobei sich nach kurzer Zeit die Cholsäure in harzigen Massen abscheidet; diese wird nach Dekantieren der Mutterlauge mit Wasser durchgeknetet und bildet nach einiger Zeit einen festen Kuchen, den man zerkleinert, trocknet, pulverisiert, zerreibt mit kaltem ammoniakhaltigen Alkohol zur Entfernung der Salzsäure, filtriert und aus heißem Alkohol ein- bis zweimal umkristallisiert. Die so erhaltene Säure darf sich nicht in ammoniakalischer Lösung mit Chlorbarium trüben, was auf die Gegenwart von Choleinsäure deuten würde. In solchem Falle löst man die Säure in Ammoniak, fällt mit Chlorbarium, versetzt das Filtrat mit Salzsäure und verfährt, wie oben angegeben.

Hammarsten empfiehlt folgende, mit Pregls Verfahren im wesentlichen übereinstimmende Arbeitsweise: Die Galle wird zuerst durch Alkoholbehandlung schleimfrei gemacht und in 5prozentiger wässriger Lösung mit $\frac{1}{4}$ Volumen 30prozentiger Natronlauge in einem eisernen Gefäße, am besten in einem Autoklaven, 30 Stunden gekocht und erkalten gelassen. Hierauf wird die Hauptmasse des Alkalis neutralisiert, filtriert, die Rohsäure mit Salzsäure gefällt, abfiltriert, mit Wasser nachgewaschen, mit Hilfe von Ammoniak gelöst, so daß die Lösung nicht mehr als 2 Proz. Gallensäure enthält, und mit einer 20 prozentigen Chlorbariumlösung versetzt, solange noch ein Niederschlag resp. Trübung entsteht, wobei sich Cholein- und Desoxycholsäure ausscheiden, die man abfiltriert und aus dem Filtrate die Rohsäure mit Salzsäure fällt. Stellt die Rohsäure einen festen Kuchen oder eine sandige Masse dar, filtriert man die Flüssigkeit ab, zerreibt die Säure mit Wasser und wäscht mit Wasser, bis die Salzsäure verschwindet; hierauf versetzt man sie unter Umrühren oder Kneten wiederholt mit starkem Alkohol, bis sie sich in einen Kristallbrei verwandelt hat. Man kann auch die vorher an der Luft getrocknete oder zerriebene Rohsäure mit 2 Teilen 95prozentigen Alkohols mischen. In beiden Fällen saugt man den Alkohol von der Kristallmasse ab, wäscht mit wenig Alkohol nach, zerreibt wieder mit Alkohol, saugt ab und wäscht mit Alkohol nach. Die so erhaltene, fast weiße Säure wird aus heißem Alkohol umkristallisiert, bis sie bei 195—196° C schmilzt. Die Kristallisationsmutterlaugen liefern nach Einengen und Umkristallisieren eine weiße Lösung vom erwähnten Schmelzpunkte.

Langheld ¹⁾ verfährt so, daß er die auf dem Wasserbade getrockneten Rohsäuren ohne vorhergehende Fällung mit Bariumchlorid mit dem doppelten ihres Gewichtes an Alkohol anrührt und den hierbei ungelöst bleibenden Teil der Cholsäure zweimal aus Alkohol umkristallisiert. Zu den vereinigten Mutterlaugen, bezüglich bei völliger Lösung der Rohsäuren, zu der ursprünglichen Lösung wird

¹⁾ K. Langheld, Über die Bestandteile der Rindergalle. Chemische Berichte 41, 380 (1908).

überschüssiges, in wenig Wasser gelöstes Natriumhydroxyd zugesetzt und die Reaktionsmasse 1—2 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. Während dieser Zeit scheidet sich das cholsaure Natrium nahezu quantitativ in Form kleiner, weißer Nadeln ab. Es wird möglichst heiß abgesaugt und mit viel siedendem Alkohol gewaschen. Die daraus in Freiheit gesetzte und getrocknete Cholsäure wird mit dem doppelten Gewicht Alkohol vermischt, wobei sie ein Molekül Kristallalkohol aufnimmt und filtriert. Das so erhaltene Produkt zeigt sofort den richtigen Schmelzpunkt 196—197° C.

Beim Verarbeiten von Sommergallen tritt häufig eine völlige Lösung der Rohsäure ein, d. h. wenn die aus dem Filtrat von der Bariumfällung oder die direkt gefällte Rohsäure keinen festen Kuchen absetzt, sondern weich bleibt und mit Wasser eine Emulsion bildet, die weder feucht, noch nach dem Eindampfen in eine kristallinische Masse beim Reiben mit Alkohol übergeht. Nach dem alten Verfahren konnte aus diesen nur auf Umwegen und mit großen Verlusten Cholsäure erhalten werden. Pregl ist in solchen Fällen in folgender Weise vorgegangen: Die aus dem Filtrat von der Bariumfällung ausgeschiedene Säure wurde getrocknet, pulverisiert, in ammoniakhaltigem Wasser zu einer 1prozentigen Lösung gelöst und dann mit so viel einer 20 prozentigen Chlorbariumlösung versetzt, als noch ein Niederschlag entstand, wobei die störend wirkenden dyslysinartigen Stoffe gefällt und aus dem neuen Filtrat durch Salzsäure eine Rohsäure ausgeschieden wurde, die in angegebener Weise mit Alkohol behandelt, kristallinisch und durch Umkristallisieren rein erhalten wurde.

Nach Bondi und Müller ¹⁾ werden 5 kg frisch entnommene Rindergalle mit 1 kg 30prozentiger Kalilauge versetzt und 30 Stunden in einem gußeisernen Topf auf freier Flamme unter Rückflußkühlung gekocht, dann 5 Liter kaltes Wasser und zu der 50° warmen Flüssigkeit konzentrierte Salzsäure zugefügt, solange noch ein Niederschlag entsteht, wobei sich die rohe, blaugrün gefärbte Cholsäure zu einem Klumpen zusammenballt. Der abgehobene Klumpen wird wiederholt mit kaltem Wasser gut durchgeknetet, um den Überschuß der Salzsäure zu entfernen, dann auf dem Wasserbade erhitzt, wobei er zuerst schmilzt und nach dem Verdampfen des Wassers zu einem harten Kuchen erstarrt. Der zerkleinerte und pulverisierte Kuchen wird in 4 Liter verdünntem Ammoniakwasser gelöst, die Lösung $\frac{1}{2}$ Stunde mit Tierkohle gekocht, das Filtrat mit überschüssiger Chlorbariumlösung und 1 Liter Alkohol versetzt und filtriert. Verdünnt man nun das Filtrat mit Wasser (auf 1 Liter Filtrat 4 Liter Wasser) und versetzt mit Salzsäure, so scheidet sich die Cholsäure fast farblos und kristallinisch aus und wird nach dem Trocknen auf dem Wasserbade durch Umkristallisieren aus möglichst wenig heißem Alkohol rein erhalten.

¹⁾ S. Bondi und E. Müller, Synthese der Glykocholsäure und Taurocholsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie 47, 499 (1906).

6. Choleinsäure

$C_{24}H_{40}O_4$ oder $C_{25}H_{42}O_4$ (nach Latschinow)¹⁾.

Eigenschaften. Sie kristallisiert aus Alkohol in hemiedrischen Kristallen des rhombischen Systems, die bei 185—187° C schmelzen. Die Säure ist sehr schwer löslich in Wasser (1 : 2200), leicht löslich in heißem und schwer in kaltem Alkohol. Sie gibt nicht die Myliussche Probe. Ihr spezifisches Drehungsvermögen in alkoholischer Lösung nach Latschinow $[\alpha]_D = +56,4^\circ$ (c = 6,06 Proz.), nach Vahlen $[\alpha]_D = +48,87^\circ$ (c = 2,5 Proz.), nach Langheld $[\alpha]_D = +47,97^\circ$.

Darstellung. Zur Gewinnung benutzt man den bei der Darstellung der Cholsäure aus Rindergalle durch Fällen mit Chlorbarium erhaltenen Niederschlag, der die Choleinsäure neben Fettsäuren und Desoxycholsäure enthält. Die Barytsalze werden durch Kochen mit Natriumkarbonatlösung in die Natronsalze übergeführt, filtriert, das Filtrat eingengt und der Rückstand mit Alkohol extrahiert. Der alkoholische Auszug wird nach dem Verdampfen des Alkohols in Wasser gelöst und die Lösung zur Entfernung der Fettsäuren mit Bariumazetat gefällt. Aus dem Filtrat erhält man auf Zusatz von Salzsäure die Choleinsäure, die sich durch Umkristallisieren aus Eisessig oder Azeton reinigen läßt (Lassar-Cohn)²⁾.

7. Lithofellinsäure

$C_{20}H_{36}O_4$.

Eigenschaften. Die Säure ist in Wasser unlöslich, schwer löslich in kaltem Alkohol und Äther, löst sich leicht in heißem Alkohol. Die kristallisierte Säure schmilzt bei 205° C und hat das spezifische Drehungsvermögen von $[\alpha]_D = +13,76^\circ$. Die Alkalisalze sind leicht löslich in Wasser, werden aus der konzentrierten heißen Lösung durch Ätzkali, kohlensaures Alkali oder andere Salze in öligen Tropfen ausgeschieden; sie kristallisieren sehr schwer, das Bariumsalz kristallisiert beim Erkalten der heißen konzentrierten wässrigen Lösung in feinen Nadeln.

Nachweis. Zum Nachweis dienen die charakteristischen Kristallformen, der hohe Schmelzpunkt, die sehr schöne Pettenkoferreaktion, die aromatischen Destillationsprodukte und das Verhalten der Alkali- und Barytsalze.

Darstellung. Die gepulverten Steine werden mit Alkohol extrahiert, der alkoholische Auszug eingengt und erkalten gelassen, wobei sich allmählich Krusten stark glänzender, farbloser, harter Kristalle abscheiden, die aus sehr spitzigen Rhomboedern oder dreiseitigen Säulen meist mit zugerundeten Flächen bestehen. Zur Reinigung versetzt man die alkoholische Lösung mit überschüssigem Natriumkarbonat, dampft zur Trockne ein, extrahiert mit absolutem Alkohol, filtriert, dampft ein, löst den Rückstand in Wasser, fällt mit Chlorbarium, filtriert und wäscht mit Wasser nach. Das Filtrat wird eingedampft, mit Essigsäure versetzt, die dabei ausgefallte Lithofellin-

¹⁾ P. Latschinow, Über eine der Cholsäure analoge Säure. Chemische Berichte **18**, 3039 (1885). Über die Choleinsäure. Ebenda **19**, 1140 (1886). Über die Gallensäuren. Ebenda **20**, 1043 (1887). Über die Kristallform der Choleinsäure. Ebenda **20**, 1053 (1887).

²⁾ Lassar-Cohn, Zur Kenntnis der Säuren der Rindergalle. I. c.

säure abfiltriert, gewaschen und aus wenig siedendem Alkohol umkristallisiert (Jünger und Klages) ¹⁾.

8. Taurin (Aminoäthylsulfonsäure)



Eigenschaften. Das Taurin kristallisiert in farblosen, oft sehr großen, glänzenden, vier- oder sechsseitigen Prismen mit vierseitigen Pyramiden an beiden Enden. Es löst sich in 15—16 Teilen kalten Wassers, in heißem Alkohol, unlöslich in gewöhnlichem und absolutem Alkohol und in Äther; bei Gegenwart von Alkali löst es sich leichter in Wasser und in Alkohol. Die Lösungen reagieren neutral und werden nicht von Metallsalzen gefällt.

Darstellung. Man kocht die Rindergalle mehrere Stunden mit verdünnter Salzsäure, dampft das von Dyslysin und Cholidinsäure getrennte Filtrat stark ein und filtriert von dem ausgeschiedenen Kochsalz und anderem Niederschlag ab, verdunstet das Filtrat zur Trockne, löst den Rückstand in 5prozentiger Salzsäure, filtriert vom ungelösten Kochsalz ab und fällt das neue Filtrat mit dem zehnfachen Volumen 95prozentigen Alkohols, wobei sich die Hauptmasse des Taurins ausscheidet und Glykokoll in Lösung bleibt. Das alkoholische Filtrat verdunstet man zur Trockne, löst wieder in Salzsäure und fällt mit Alkohol, um die Reste des Taurins zu isolieren. Das Taurin wird leicht durch Umkristallisieren aus heißem Wasser rein erhalten.

Die saure alkoholische glykokollhaltige Lösung verdunstet man zur Trockne, löst den Rückstand in Wasser, zersetzt die Lösung mit Bleihydroxyd, entbleit das Filtrat mit Schwefelwasserstoff und dampft stark ein. Die ausgeschiedenen Kristalle des Glykokolls löst man in Wasser, entfärbt mit Tierkohle und dampft bis zur Kristallisation ein (Hammarsten) ²⁾.

J. Gallenfarbstoffe.

1. Bilirubin $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$.

Eigenschaften. Das Bilirubin tritt in amorpher und kristallinischer Form auf. Das amorphe Bilirubin stellt ein rotgelbes Pulver von fast derselben Farbe wie das Schwefelantimon dar; das kristallinische Bilirubin ist seiner Farbe nach der kristallisierten Chrmsäure ähnlich. Die Kristalle, die durch Verdunstung einer Lösung von Bilirubin in Chloroform erhalten werden, bilden rotgelbe, rhombische Tafeln mit abgerundeten stumpfen Winkeln. Aus heißem Dimethylanilin kristallisiert es meist in großen breiten, rhombischen Säulen oder auch in langgestreckten Nadeln. Es ist unlöslich in Wasser, sehr wenig löslich in Äther, Benzol, Schwefelkohlenstoff, Amylalkohol, fetten Ölen und Glycerin, in Alkohol ist es weniger schwer löslich; in kaltem Chloroform ist es im Verhältnis von 1 : 600, in warmem ist es viel leichter löslich. Alle Lösungen haben gelbe bis bräunlichrote Farbe, in einer 1,5 cm dicken Schicht ist noch bei 500 000facher Verdünnung deutlich gelbe Farbe zu erkennen. Die Alkaliverbindungen des Bilirubins sind in Chloroform unlöslich, und durch Schütteln mit verdünnter Alkalilauge kann man das Bilirubin aus der Chloroformlösung entfernen.

Nachweis. Setzt man einer verdünnten Lösung von Bilirubinalkali in Wasser Ammoniak im Überschuß und darauf Chlorzinklösung hinzu, so wird

¹⁾ Jünger und Klages, Chemische Berichte **28**, 3045 (1895).

²⁾ O. Hammarsten, Untersuchungen über die Gallen einiger Polar-tiere. Zeitschr. f. physiol. Chemie **32**, 435 (1901).

die Lösung zuerst tief orange gefärbt, ändert aber allmählich ihre Farbe und wird olivenbraun und dann grün. In dem Spektrum, dessen violetter und blauer Teil erst stark verdunkelt wird, sieht man die Streifen des Cholezyanins oder jedenfalls den Streifen dieses Farbstoffs in Rot zwischen D und C, nahe an C.

Die Gmelinsche Reaktion. Überschiebt man in einem Reagenzglas Salpetersäure, die etwas salpetrige Säure enthält, mit einer wässrigen Bilirubinlösung, so daß sich die Flüssigkeiten nicht zu sehr an der Grenze mischen, so erhält man an der Berührungsstelle beider Flüssigkeiten nacheinander eine Reihe von farbigen Schichten, die von oben nach unten gesehen, folgende Farbenskala bilden: grün, blau, violett, rot und rotgelb. Die Reaktion ist empfindlich noch bei einer Verdünnung von 1 : 80000. Der grüne Ring darf nie fehlen, auch der rotviolette muß gleichzeitig vorhanden sein, die Salpetersäure darf nicht zuviel salpetrige Säure enthalten, weil die Reaktion nicht typisch wird, ferner darf kein Alkohol zugegen sein, weil er mit der Säure ein grünes oder blaues Farbenspiel geben kann.

Reaktion von Hammarsten. Das Reagens bereitet man in der Weise, daß man das aus 1 Volumen 25prozentiger Salpetersäure und 19 Volumen 25prozentiger Salzsäure bestehende Säuregemisch zuerst durch Stehenlassen gelblich werden läßt, dann mit Alkohol im Verhältnis 1 : 4 mischt. Versetzt man einige Kubikzentimeter dieser farblosen Lösung mit einigen Tropfen einer Bilirubinlösung, so färbt sie sich sofort schön grün, und fährt man mit dem Zusatz des Säuregemenges steigend fort, so liefert die grüne Flüssigkeit sämtliche Farben der Gmelinschen Skala bis zum Choletelin.

Reaktion von Huppert. Versetzt man eine Lösung von Bilirubinalkali mit Kalkmilch oder mit Chlorkalzium und Ammoniak, so scheidet sich Bilirubinkalk aus. Wäscht man den Niederschlag mit Wasser aus, bringt ihn noch feucht in ein Reagenzglas, füllt dieses zur Hälfte mit salzsäurehaltigem Alkohol und erhitzt zum Kochen, so nimmt die Flüssigkeit eine smaragdgrüne oder blaugrüne Farbe an.

Darstellung. Zur Darstellung der Farbstoffe benutzt man Gallensteine, die getrocknet und fein pulverisiert und im Soxhletschen Apparate mit Äther 1 Tag lang extrahiert, der Cholesterin, Fett und einen färbenden Stoff aufnimmt. Das entfettete Pulver wird dann mit heißem Wasser wiederholt ausgekocht, bis das Waschwasser wenig oder nicht mehr gefärbt erscheint. Dann laugt man das Pulver mit Salzsäure oder mit Essigsäure aus, wäscht es mit Wasser und Alkohol säurefrei; trocknet es bei 100° C und extrahiert wieder im Soxhletapparat mit Äther 1 Tag lang und darauf mit Chloroform bis zur Erschöpfung. Aus der Chloroformlösung scheidet sich das Bilirubin in Krusten ab, während ein ihm nahestehender, durch Alkohol fällbarer, stickstoffärmerer Farbstoff in Lösung bleibt. Zur Reinigung wird das Bilirubin zwei- bis dreimal mit Chloroform behandelt, dann erschöpfend mit Alkohol ausgezogen, der Rückstand in Chloroform gelöst und durch Alkohol als amorphes Pulver oder aus kochendem Dimethylanilin kristallinisch erhalten.

2. Biliverdin $C_{16}H_{18}N_2O_4$.

Eigenschaften. Das Biliverdin ist ein Oxydationsprodukt des Bilirubins. Es stellt einen amorphen dunkelgrünen Körper dar, der beim Verdampfen seiner Lösung in Eisessig in unvollkommenen, grün gefärbten, rhombischen Plättchen mit abgestumpften Ecken kristallisiert. Es ist in Wasser Äther und Chloroform unlöslich, löst sich in Alkohol und Eisessig mit schön grüner Farbe. In verdünnten Alkalien löst es sich mit braungrüner Farbe und wird aus dieser Lösung von Säuren, sowie von Kalk-, Baryt- und Bleisalzen wieder gefällt.

Nachweis. Das Biliverdin wird mittels der Huppertschen, Gmelinschen und Hammarstenschen Reaktion nachgewiesen. Vom Bilirubin unter-

scheidet es sich durch seine grüne Farbe, seine Löslichkeit in Alkohol und Unlöslichkeit in Chloroform.

Darstellung. Man löst 1 g Bilirubin in 35 ccm $\frac{1}{10}$ Normalkalilauge (1 Molekül Bilirubin und 1 Molekül Kalihydrat), setzt $\frac{1}{2}$ Liter Wasser hinzu, filtriert, bringt das Filtrat in eine große Porzellanschale und läßt 3 Wochen an der Luft stehen, wobei die Temperatur 5° C nicht übersteigen darf. Die grün gewordene Lösung versetzt man mit 35 ccm $\frac{1}{10}$ Normalsalzsäure, wobei ein Niederschlag entsteht, der abfiltriert, mit Wasser bis zum Verschwinden der Salzsäurereaktion gewaschen und noch feucht in Alkohol gelöst wird. Die Lösung wird filtriert, der größte Teil des Alkohols unter vermindertem Druck abgedampft und der Rückstand in Wasser gegossen, wobei das Biliverdin ausfällt und dann abfiltriert wird (Städeler).

Hugounencq und Doyon¹⁾ stellen das Biliverdin aus dem Bilirubin mittels Natriumsuperoxyd dar, indem sie 10 g Bilirubin in 200 g einer 5prozentigen Natronlauge lösen, in die Lösung 2 g Natriumsuperoxyd eintragen und 60 Stunden im siedenden Wasserbade erwärmen, wobei die Zersetzung des Farbstoffes unter Ammoniakentwicklung stattfindet. Hierauf säuert man die alkalische Lösung mit Schwefelsäure an, wobei reichliche Mengen Kohlensäure entweichen, verjagt dann mit Wasserdämpfen die flüchtigen sauren Zersetzungsprodukte und entfernt die Rohhämatinsäure durch Ausschütteln mit Äther.

3. Hydrobilirubin $C_{32}H_{40}N_4O_7$.

Eigenschaften. Das Hydrobilirubin ist ein rotbraunes Pulver, das in Wasser sehr wenig, in Alkohol, Chloroform und Alkalien leicht löslich ist; aus den Lösungen in Alkalien wird es durch Säuren wieder gefällt. Die alkalischen Lösungen des Farbstoffs sehen gelb aus, sauer reagierende dagegen rot; letztere zeigen einen deutlichen Absorptionsstreifen, während ammoniakalische einen solchen erst auf Zusatz von etwas Zinksulfatlösung hervortreten lassen; zugleich tritt grüne Fluoreszenz der im durchgehenden Lichte granat- bis rosenroten Lösung ein.

Darstellung. Man suspendiert Bilirubin in Wasser und versetzt mit Natriumamalgam, worauf sich der Farbstoff löst und zugleich reduziert wird, was am Eintreten einer helleren Farbe zu erkennen ist. Man läßt unter öfterem Umschütteln 2—4 Tage stehen, erwärmt zuletzt auf dem Wasserbade, wodurch die Reduktion vollendet wird, gießt vom ausgeschiedenen Quecksilber ab und versetzt die Lösung mit Salzsäure oder Essigsäure. Es tritt dabei dunkelgranatrote Färbung ein, und das Hydrobilirubin fällt allmählich in dunkelbraunroten Flocken aus (R. Maly²⁾).

4. Fett und Lipide.

Man dampft Rindergalle bis zum dicken Sirup ein, extrahiert diesen mit starkem Alkohol, kocht die alkoholische Lösung mit Tierkohle, dampft das Filtrat auf ein kleines Volumen ein und versetzt

¹⁾ Hugounencq und Doyon, Archiv de Physiologie (5) 8.

²⁾ R. Maly, Über die Umwandlung von Bilirubin in Harnfarbstoff. Liebigs Annalen 163, 77 (1872).

mit einem Überschuß von Äther. Die von dem ausgeschiedenen Niederschlag (Plattners kristallisierte Galle) abfiltrierte ätheralkoholische Lösung enthält Fett, Cholesterin, Lezithin und Harnstoff usw., die nach den S. 107 angegebenen Verfahren nachgewiesen und bestimmt werden.

5. Harnstoff.

Das ätheralkoholische Filtrat (s. oben) wird vorsichtig verdunstet, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, filtriert und im Filtrat der Harnstoff nach der auf S. 181 angegebenen Vorschrift nachgewiesen und quantitativ bestimmt.

6. Quantitative Analyse der Galle nach Hoppe-Seyler und Hammarsten ¹⁾.

Man befreit etwa 50 ccm (bei geringem spezifischen Gewicht verwendet man 400—800 ccm) Blasengalle durch Zentrifugieren von etwa vorhandenen zähen Massen oder Klümpchen, wägt und versetzt unter Umrühren mit etwa der zehnfachen Menge Alkohol. Am nächsten Tage wird der ausgeschiedene Niederschlag auf ein gewogenes, aschefreies Filter gebracht, mit kaltem und dann mit heißem Alkohol gewaschen, mit Alkohol in dasselbe Becherglas übergespült, auf dem Wasserbade bei 40—45° C erwärmt, der Niederschlag auf dasselbe Filter gebracht und so lange mit Alkohol in derselben Weise behandelt, bis dieser sich nicht mehr färbt. Man erhält so einen Rückstand A und ein alkoholisches Filtrat B, die in folgender Weise behandelt werden.

A. Rückstand, der aus Gallenschleim mit etwas anhaftendem Farbstoff und anorganischen Salzen besteht, wird mit Essigsäure und essigsäurehaltigem Wasser ausgewaschen, wodurch die anorganischen Salze entfernt werden, bei 100—105° C getrocknet, gewogen, verascht, die Asche gewogen und man erfährt so aus der Differenz der beiden Wägungen die Menge von Gallenschleim + Farbstoff und von Ferriphosphat. Die Phosphate, Sulfate und Chloride des essigsauren Filtrats werden weiter unten (B. 2 a) bestimmt.

B. Alkoholisches Filtrat. Man dampft das alkoholische Filtrat stark ein, versetzt den Rückstand mit Äther bis zur beginnenden Fällung und dann mit Wasser, schüttelt vorsichtig um und läßt stehen, wobei sich das Gemisch in eine obere dunkle, ätherisch-alkoholische Lösung (1) und eine untere, fast farblose oder blaßgelbe, wässerig-alkoholische Lösung (2) trennt. Erstere läßt man zuerst bei gewöhnlicher Temperatur stehen und erwärmt dann zum vollständigen Verjagen des Äthers auf 40° C, löst den Rückstand in Alkohol, schüttelt wieder mit Äther und Wasser, wiederholt diese Manipulation noch einmal und vereinigt die wässerig-alkoholischen Lösungen.

1. Ätherisch-alkoholische Lösung. Die aus Cholesterin, Lezithin und Fett bestehende ätherisch-alkoholische Lösung läßt man zuerst bei gewöhnlicher Temperatur und dann bei 40—45° C verdunsten, nimmt den Rückstand mit absolutem Äther auf und vereinigt den unlöslichen Rückstand mit der wässerig-alkoholischen Lösung. Läßt man die ätherische Lösung verdunsten und trocknet im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure und wägt, so erfährt man den Gehalt an Fett + Lezithin und Cholesterin. Die Trennung und Bestimmung der einzelnen Bestandteile geschieht nach der S. 107 angegebenen Vorschrift.

2. Wässerig-alkoholische Lösung. Man dampft die die gallensauren Alkalien, ätherschwefelsaures Alkali, Seifen, Harnstoff und anorganische Salze enthaltende wässerig-alkoholische Lösung ein, nimmt den Rückstand mit Alkohol auf, filtriert vom Ungelösten ab und wiederholt diese Behandlung, bis der Alkohol sich nicht mehr färbt resp. bis er alles erschöpfend gelöst hat. Man erhält so einen Rückstand (a) und eine alkoholische Lösung (b).

a) Der aus anorganischen Salzen bestehende Rückstand wird mit dem Rückstand A der erwähnten essigsauren Lösung vereinigt, getrocknet, verascht und gewogen, wodurch man die Menge der in Alkohol unlöslichen anorganischen

¹⁾ O. Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chemie 32, 439 (1901).

Salze, mit Ausnahme des schon bestimmten Ferriphosphats (Phosphate, Sulfate und ein Teil der Chloride) erhält.

b) Die alkoholische Lösung dampft man auf ein kleines Volumen ein, fällt mit Äther, dampft das Filtrat ein, nimmt den Rückstand mit absolutem Äther auf, löst das Ungelöste in Alkohol und vereinigt mit der ebenfalls in Alkohol gelösten Ätherfällung. Etwa noch vom Äther gelöste Anteile müssen der ätherisch-alkoholischen Lösung (1) zugefügt werden. Diese alkoholische Lösung, die die gallensauren Salze, Harnstoff und Alkalichloride enthält, wird genau gemessen und in vier gemessene Portionen geteilt.

Portion 1 wird zur Trockne eingedampft, bei 100—105° C getrocknet, gewogen, verascht und wieder gewogen. In der Asche wird die Salzsäure in der üblichen Weise bestimmt, auf Natriumchlorid berechnet und dieser Wert von dem Trockengewicht abgezogen, so ergibt die Differenz den Gehalt an gallensauren Salzen, ätherschwefelsaurem Salz, Seifen und Harnstoff.

Portion 2. Man bestimmt im Trockenrückstand den Gesamtschwefel als Bariumsulfat.

Portion 3. Zur Bestimmung der Ätherschwefelsäure dampft man auf dem Wasserbade bis zur Trockne ein, löst in so viel Wasser, daß man eine 2prozentige Lösung erhält, die man mit einer 5prozentigen Chlorbariumlösung versetzt und stehen läßt. Man filtriert, versetzt mit 5prozentiger Salzsäure, erwärmt einige Stunden auf dem Wasserbade und dampft dann zur Trockne ein. Hierauf digeriert man den Rückstand wiederholt mit Alkohol und Wasser, filtriert, wäscht ihn auf dem Filter mit heißem Wasser, verdünnter Salzsäure, Wasser, Alkohol und Äther aus, glüht bis zur Gewichtskonstanz und wägt nach dem Erkalten im Exsikkator. Die so gefundene Menge Bariumsulfat wird auf Schwefel der Ätherschwefelsäure berechnet.

Portion 4. Man dampft ein, nimmt den Rückstand mit nicht zuviel Wasser auf, bringt die Lösung quantitativ in ein Schmelzrohr, in das man vorher 5 g kristallisierten Ätzbaryt eingetragen hat, schmilzt etwa 10 cm über dem Flüssigkeitsniveau zu, schüttelt nach dem Erkalten gut um und erhitzt 10—12 Stunden im Schießofen oder im Autoklaven auf 110—120° C. Nach dem Erkalten öffnet man vorsichtig, gießt die Flüssigkeit in ein Becherglas, spült mit warmem Wasser nach, sättigt mit Kohlensäure zur Entfernung des überschüssigen Baryts, kocht, filtriert heiß und wäscht mit heißem Wasser bariumfrei nach. Den Rückstand kocht man mit Salzsäure, schüttelt die Lösung wiederholt mit Äther aus, trennt die ätherische Schicht ab, läßt den Äther verdunsten und wägt den Rückstand, der aus Palmitinsäure, Stearinsäure und Oleinsäure besteht.

Das Filtrat samt Waschwasser wird eingedampft, im Rückstand der Schwefel in der üblichen Weise als Bariumsulfat bestimmt. Da diese Menge dem Taurinschwefel entspricht, so erhält man den Gehalt an Taurocholsäure, wenn man die gefundene Menge Bariumsulfat mit dem Faktor 2,2089 multipliziert. Der Gehalt an Taurocholsäure läßt sich indirekt berechnen, wenn man die der Ätherschwefelsäure entsprechende Bariumsulfatmenge von der dem Gesamtschwefel entsprechenden Bariumsulfatmenge abzieht und die Differenz mit 2,2089 multipliziert.

Die glykocholsauren Salze lassen sich in der Weise berechnen, daß man die gefundene Menge Taurocholsäure durch Multiplikation

mit 1,043 auf taurocholsaures Natron die erhaltene Menge Fettsäuren durch Multiplikation mit 1,10 auf Seifen umrechnet und die Summe dieser beiden Werte und den Gehalt der Galle an Harnstoff von dem Wert für gallensaure Salze + ätherschwefelsaures Salz + Seifen + Harnstoff abzieht.

Die geringen Mengen Harnstoff können mit Rücksicht auf die Ungenauigkeit der Methode im allgemeinen vernachlässigt werden.

7. Gallensteine, Gallensedimente.

Man reinigt das zu untersuchende Material durch Kochen mit Wasser von den Gallenresten, trocknet es, zerreibt es zu einem feinen Pulver, das man mit einer Mischung von gleichen Teilen Alkohol und Äther bis zur Erschöpfung extrahiert, filtriert und wäscht mit derselben Mischung nach. Die abfiltrierten Auszüge lassen beim Verdunsten einen Rückstand, der hauptsächlich aus Cholesterin besteht, zu dessen Nachweis und quantitativer Bestimmung man sich der auf S. 107 angegebenen Reaktion bedient.

Der nach der Extraktion mit Alkohol-Äther zurückgebliebene Rückstand wird mit Salzsäure ausgezogen, der salzsaure Auszug zur Trockne eingedampft, der Rückstand gegläht, in verdünnter Salzsäure gelöst und die Lösung auf anorganische Salze in der auf S. 114 angegebenen Weise untersucht.

Der nach dem Ausziehen mit Salzsäure gebliebene Rückstand wird getrocknet, mit heißem Chloroform aufgenommen, das Chloroform verdunstet, der Rückstand in Natronlauge gelöst und die Lösung auf Bilirubin (s. dieses) geprüft. Nachdem die Lösung durch Behandeln mit Tierkohle vom Bilirubin mehr oder weniger befreit worden ist, untersucht man auf etwa gleichzeitig vorhandenes Urobilin mittels des Spektroskops.

Darstellung des Cholesterins. Die Cholesterinsteine werden zunächst in oben angegebener Weise gereinigt, fein pulverisiert, das Pulver wiederholt mit Alkohol ausgekocht oder besser im Soxhletapparat extrahiert. Die vereinigten filtrierten Alkoholauszüge engt man etwas ein, das beim Erkalten auskristallisierte Cholesterin kocht man mit alkoholischer Kalilauge, um das Fett zu verseifen. Hierauf verdampft man auf dem Wasserbade den Alkohol, extrahiert den Rückstand mit Äther, wobei das Cholesterin in Lösung geht, während die Seifen zurückbleiben, filtriert, verdampft den Äther und kristallisiert das Cholesterin aus Alkohol-Äther um.

K. Verdauung.

1. Speichel.

Die Reaktion des Speichels ist in der Regel gegen Lackmus alkalisch, aber nicht gegen Phenolphthalein, sein spezifisches Gewicht schwankt zwischen 1,002 und 1,008.

Proteinstoffe. Entsteht beim Versetzen des Speichels mit Essigsäure ein Niederschlag, so liegt Muzin vor, das man in der angegebenen Weise identifiziert. Trübt sich das Filtrat beim Kochen sowie auf Zusatz von Ferrozyankalium, so ist Eiweiß zugegen.

Ptyalin oder Speicheldiastase. Zur Isolierung des Ptyalins versetzt man den Speichel mit etwas verdünnter Phosphorsäure und darauf Kalkwasser bis zur neutralen oder schwach alkalischen Reaktion, wobei der ausfallende Niederschlag von Kalziumtriphosphat das Ptyalin teilweise mitreißt, das beim Auswaschen des Niederschlages mit Wasser in Lösung geht. Die so erhaltene wässrige Lösung wird mit Alkohol gefällt, der Niederschlag in Wasser gelöst und wieder mit Alkohol gefällt.

Die Wirkung des Ptyalins besteht darin, daß es Stärke in Dextrine und Zucker überführt. Versetzt man eine Stärkelösung mit dem 10. Teil Speichel, so kann man nach kurzer Zeit (nach einigen Minuten) mit der Trommerschen Probe Dextrin und Maltose nachweisen: bei Bruttemperatur vollzieht sich der Prozeß schneller. Es bilden sich dabei Erythroextrine, Achrooextrine, Maltose und Isomaltose, die man an der Färbung mit Jodjodkaliumlösung erkennen kann: während Amylum sich blau färbt, geben die Erythroextrine eine Rotfärbung, und die Achrooextrine reagieren gar nicht.

Quantitative Bestimmung. Die von Wohlgemuth ¹⁾ angegebene Methode besteht im folgenden. Man beschickt eine Reihe von Reagenzgläsern mit absteigenden Mengen Speichel, fügt zu jeder Portion 5 ccm einer 1prozentigen Stärkelösung zu und stellt sofort jedes Röhrchen in ein Gefäß mit Eiswasser, in dem sich ein Drahtkorb zur Aufnahme der Gläschen befindet, um die Fermentwirkung zunächst vollständig auszuschließen. Dann bringt man den Drahtkorb mit den Gläschen in ein Wasserbad von 40° C, wobei die Fermentwirkung in allen Gläschen zu derselben Zeit beginnt, läßt bei dieser Temperatur 30–60 Minuten stehen und bringt nach Ablauf dieser Zeit wieder in das Gefäß mit Eiswasser auf 1 Stunde, so daß die Fermentwirkung in sämtlichen Portionen zu derselben Zeit unterbrochen wird. Zur Bestimmung der Fermentlösung füllt man die Reagenzgläschen bis fingerbreit vom Rande mit Wasser, setzt je einen Tropfen einer 1 Normaljodlösung zu und schüttelt um, wobei verschiedene Färbungen entstehen. Die gelb bis rotgelb gefärbten Gläschen erhalten nur noch Achrooextrin resp. Erythroextrin, die blauvioletten enthalten ein Gemisch von Erythroextrin und Stärke und endlich die mit einer dunkelblauen Färbung vorwiegend unveränderte Stärke. Als unterste Grenze der Wirksamkeit (limes) bezeichnet man dasjenige Gläschen, in dem zum erstenmal die blaue Farbe erkennbar ist. Danach ist in dem vorhergehenden Gläschen sämtliche Stärke bis zum Dextrin abgebaut. Aus ihm berechnet sich die Größe des Ferments in der

¹⁾ J. Wohlgemuth, Über eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung des diastatischen Fermentes. *Biochem. Zeitschr.* 9, 1 (1908).

Weise, daß die Anzahl Kubikzentimeter einer 1prozentigen Stärkelösung bestimmt wird, die durch 1 ccm der Fermentlösung in der angewandten Zeit bis zum Dextrin total abgebaut wird. Das Dextrin enthalte beispielsweise 0,02 ccm Speichel; es wären dann 0,02 ccm imstande, in 30 Minuten 5 ccm 1prozentiger Stärkelösung in Dextrin umzuwandeln, mithin 1 ccm Speichel = 250 ccm 1prozentiger Stärkelösung. Bezeichnet man die diastatische Kraft für 1 ccm Fermentlösung mit D und gibt die Temperatur und Zeitdauer des Versuches an, so würde sich ergeben $D_{30'}^{40^{\circ}} = 250$.

Maltase. Zum Nachweis der Maltase versetzt man 10 ccm Speichel mit 20 ccm einer 5prozentigen Maltoselösung, fügt Toluol zu und läßt im Brutschrank 24 Stunden stehen. Hierauf erhitzt man das Gemisch unter schwachem Ansäuern mit Essigsäure zum Kochen, wobei Eiweiß und Muzin ausfallen, und weist im Filtrat den entstandenen Traubenzucker mittels der Phenylhydrazinprobe nach.

2. Der Magensaft.

Der Magensaft wird gewonnen eine Stunde nach Darreichung eines „Probefrühstücks“, bestehend aus 70 g einem Tag altem Weißbrot und einer Tasse Tee, oder 3 Stunden nach einer „Probemahlzeit“, bestehend aus einem großen Teller Suppe, etwa 200 g, und Weißbrot. Der Magensaft soll dann normalerweise keine wesentlichen unverdauten Massen enthalten.

Die wichtigste Untersuchung des Magensaftes ist der Nachweis und die Bestimmung der Salzsäure.

Die Salzsäure ist im Magensaft während der Verdauungstätigkeit in dreifacher Form vorhanden:

1. gebunden an anorganische Basen (NaCl, KCl usw.),
2. gebunden an Eiweißstoffe und organische Basen,
3. völlig frei.

Die an anorganische Basen gebundene HCl interessiert den Kliniker nicht; er will wissen, ob und wieviel freie Salzsäure, ob und wieviel an organische Stoffe „gebundene“ Salzsäure vorhanden ist. Die Summe beider bezeichnet man als Gesamtsalzsäure. Es ist die Summe der sezernierten Salzsäure, der eine Teil hat seine physiologische Wirksamkeit bereits ausgeübt und ist an organische Substanzen, speziell Eiweißkörper, Peptone usw. gebunden; die freie HCl stellt den Überschuß der Sekretion über das notwendige Minimum dar. Im Magensaft während des Hungers, wo die Salzsäure keine physiologische Wirksamkeit entfalten kann, ist die „Gesamtsalzsäure“ identisch mit der „freien“ Salzsäure, da „gebundene“, d. h. an organische Substanzen gebundene Salzsäure unter diesen Umständen nicht vorhanden ist. Diese grundlegenden Begriffsbestimmungen sind nicht immer klar gefaßt worden und haben zu manchen Mißverständnissen geführt. Kompliziert wird die Sache dadurch, daß außer Salzsäure auch noch andere Säuren, wie Milchsäure, Buttersäure usw., im Magen-

inhalt vorkommen. Diese sind jedoch bei Anwesenheit von Salzsäure stets in freiem Zustand vorhanden, da die stärkere Salzsäure sie aus ihren Verbindungen austreibt.

Wir müssen demzufolge nachstehende verschiedenen Fragestellungen unterscheiden.

1. Bestimmung der Gesamtazidität. Diese umfaßt:

I. Gesamtsalzsäure:

a) freie Salzsäure.

b) gebundene Salzsäure.

II. Andere saure Bestandteile:

c) freie organische Säuren,

d) saure Phosphate ¹⁾.

2. Bestimmung der Azidität der freien Säuren. Diese umfaßt:

a) freie Salzsäure,

b) freie organische Säuren.

3. Bestimmung der Gesamtsalzsäure. Diese umfaßt:

a) die freie Salzsäure,

b) die organisch gebundene Salzsäure.

4. Bestimmung der freien Salzsäure.

Für alle diese Fragestellungen gibt es verschiedene Methoden. Wir wollen sie einzeln in qualitativer und quantitativer Ausführung besprechen.

1. Bestimmung der Gesamtazidität.

Man bestimmt den Äquivalenzwert von freier HCl, organisch gebundener HCl und freien organischen Säuren, indem man mit $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge unter Benutzung von Phenolphthalein als Indikator titriert.

Zur Ausführung schüttelt man den Magensaft kräftig um, mißt dann 20 ccm des unfiltrierten ²⁾ Saftes in einem Meßzylinder ab, verdünnt in einem anderen Meßzylinder auf 300 (bei stark gefärbtem Magensaft auf 500 ccm) und bringt je eine Hälfte in ein Becherglas; dann setzt man zu beiden je 3 Tropfen einer 1prozentigen alkoholischen Phenolphthaleinlösung und titriert mit der $\frac{1}{10}$ Normalkalilauge, bis der Umschlag nach rot eingetreten ist. Zur Kontrolle verwendet man das nicht titrierte zweite Glas, um den Farbumschlag besser sehen zu können. Die zweite Portion wird dann ebenfalls titriert.

Weil man hier tatsächlich nicht nur die wirksame Salzsäure des Magensaftes, sondern andere unwichtige saure Bestandteile mit bestimmt, so ist es am empfehlenswertesten, wenn man die Alkalimenge, die zur Titration verbraucht war, nicht auf Salzsäure umrechnet (1 ccm einer $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge gibt 0,00365 g HCl an); son-

¹⁾ Wenn diese jemals Fehlerquellen bedingen, so sind sie so minimal, daß man ihre Anwesenheit gleich vernachlässigen kann.

²⁾ Die Bestimmung im filtrierten Magensaft bedingt nach Martius und Lüttke eine Fehlerquelle.

dem die gefundene Zahl der Kubikzentimeter Alkalilauge als „Aziditätsgrad“ verzeichnet. Der normale Aziditätsgrad des Magensaftes ist für 100 ccm Magensaft 40—60 ccm $\frac{1}{10}$ Normalalkalilauge. Diese würden einem Salzsäuregehalt von 0,146—0,219 Proz., berechnet auf reine HCl, entsprechen. Findet man also den Aziditätsgrad zu hoch, z. B. 70, so haben wir Hyperazidität, ist er zu gering, so besteht Hypazidität. Diese Bestimmungsmethode ist naturgemäß sehr roh, da man das Verhältnis des physiologisch wichtigsten Bestandteils, der Salzsäure, zu den anderen sauren Bestandteilen nicht bestimmen kann. Nichtsdestoweniger wird die Methode klinisch viel geübt und ist, wenn man die Abwesenheit von Milchsäure qualitativ nachgewiesen hat, für relative Wertbestimmungen wohl zu brauchen, da gerade die Milchsäure es ist, die bei reichlicher Anwesenheit einen scheinbar sehr hohen Salzsäuregehalt vortäuschen kann, während er vielleicht abnorm gering ist. Wissenschaftlich exakt sind nur die Methoden, bei denen nur der Wert der Salzsäure bestimmt wird.

2. Bestimmung der Azidität der freien Säuren.

a) Nachweis der freien Salzsäure.

Der Nachweis der freien Salzsäure beruht darauf, daß eine Reihe von Farbstoffen schon mit sehr kleinen Mengen Salzsäure eine charakteristische Färbung geben, während sie von Milchsäure und anderen organischen Säuren nicht oder erst bei einer Konzentration der letzteren, die im Mageninhalt kaum vorkommen kann, die charakteristischen Farbenwechsel zeigen.

Kongopapier. Ein mit dem Farbstoff Kongo getränktes Filtrierpapier färbt sich intensiv blau bis blauschwarz. Eine schwache Blaufärbung ruft auch Milchsäure hervor.

Methylviolett. Versetzt man eine stark verdünnte wässrige Lösung von Methylviolett mit einigen Kubikzentimetern Magensaft, so tritt Blaufärbung ein.

Tropaeolin 00. Werden 4—5 Tropfen einer gesättigten alkoholischen Tropaeolinlösung in einer Porzellanschale verteilt, ebensoviel Tropfen des zu untersuchenden Magensaftes hinzugesetzt, beide Flüssigkeiten durch Umschwenken gemischt und vorsichtig mit kleiner Flamme erhitzt, so bildet sich ein violetter bis lilaroter Spiegel (Boas).

Phlorogluzin-Vanillin. Man bringt in eine Porzellanschale 4—5 Tropfen einer Lösung, die 2 Teile Phlorogluzin, 1 Teil Vanillin und 30 Teile Alkohol enthält, fügt 5 Tropfen des zu untersuchenden Magensaftes hinzu und erhitzt vorsichtig unter Umschwenken und Daraufblasen mit kleiner Flamme, wobei sich intensiv rote Spiegel bilden. Diese Reaktion ist die empfindlichste, sie zeigt 0,1 Promille freie Salzsäure an. Im Gegensatz zu den übrigen gibt sie auch bei konzentrierter Milchsäure ein negatives Resultat (Günzburg).

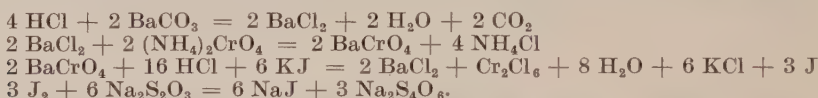
b) Bestimmung der an organische Stoffe gebundenen Salzsäure.

Man titriert wie bei der Bestimmung der Gesamtazidität, nur verwendet man als Indikator nicht Phenolphthalein, sondern Tropaeolin (1prozentige alkoholische Lösung), das sich schon rot färbt, wenn nur die Affinität der freien Säuren durch Alkali gesättigt ist, während Phenolphthalein erst dann rot wird, wenn auch die gebundene Salzsäure neutralisiert ist. Die Differenz beider Bestimmungen entspricht der sog. gebundenen, d. h. an organische Stoffe gebundenen Salzsäure.

Töpfer verwendet zu demselben Zweck eine 1prozentige wässrige Alizarinlösung als Indikator, das durch Alkali violett gefärbt wird. Dieser Farbstoff verhält sich der gebundenen Salzsäure gegenüber negativ, während er für alle anderen hier in Betracht kommenden Aziditätsfaktoren sehr empfindlich ist. Man titriert 10 ccm Magensaft unter Zusatz von 4 Tropfen alizarinsaurem Natrium als Indikator, bis die Farbe in Violett umschlägt.

3. Bestimmung der Gesamtsalzsäure.

Diese von Mörner und Sjöqvist vorgeschlagene Methode beruht darauf, daß beim Eintrocknen von Magensaft mit Bariumkarbonat und Verkohlen des Rückstandes die organischen Säuren unlösliches Bariumkarbonat, die Salzsäure lösliches Bariumchlorid geben. Die Menge des gelösten Bariums bestimmt man, indem man das Bariumchlorid in Bariumchromat umwandelt, dieses mit Salzsäure und Jodkalium versetzt und das frei verwendete Jod mit Natriumthiosulfat titriert. Die Reaktion verläuft nach folgender Gleichung:



10 ccm Magensaft werden in einer Platinschale unter Zusatz einer geringen Menge Bariumkarbonat bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand verkohlt, bis keine empyreumatischen Dämpfe mehr entweichen, und zieht die so erhaltene Kohle mit heißem Wasser aus, bis zum Verschwinden der Chlorreaktion. Das Filtrat (etwa 50 ccm) versetzt man mit Ammoniumazetatlösung (Neutralisation von 25prozentiger Essigsäure mit 10prozentigem Ammoniak), kocht auf und fällt mit 4 ccm einer 6prozentigen Ammoniumchromatlösung. Nach 2 Stunden filtriert man, wäscht den Niederschlag mit Wasser aus, löst ihn in Wasser durch Zusatz von einigen Tropfen Salzsäure, fügt 2 ccm Jodkaliumlösung (50 : 100) und 5 ccm Salzsäure hinzu und titriert mit Natriumthiosulfatlösung (31 g unkristallisiertes $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ im Liter), von der 1 ccm etwa 3 mg HCl entspricht, unter Zusatz von Stärke, bis die intensiv blaue Farbe in eine blaßgrüne umschlägt.

Das Lüttke-Verfahren beruht auf folgendem Prinzip. Man bestimmt zunächst den Gesamtchlorgehalt des Mageninhaltes durch Titration mit Silbernitrat. Dieser Gesamtchlorgehalt setzt sich zusammen:

1. Aus dem Chlorgehalt der im Mageninhalt vorhandenen anorganischen Chlorverbindungen (im wesentlichen Kochsalz);
2. aus dem Chlorgehalt der sezernierten Salzsäure (Gesamtsalzsäure = gebundener + freier HCl).

Glüht man nun den Mageninhalt bis zur Zerstörung der organischen Substanz, so geht die freie und die organisch gebundene Salzsäure fort, während die anorganischen Chloride unverändert bleiben. Eine jetzt erneute Chlorbestimmung gibt also den Anteil der anorganischen Chloride am Gesamtchlorgehalt an. Die Differenz beider Werte ergibt also den Wert für den Teil des Gesamtchlors,

der nicht an anorganischen Basen gebunden war, sondern den Chlorgehalt der Gesamtsalzsäure darstellt.

Die Bestimmung des Chlorgehaltes geschieht durch Titration mit Silbernitrat nach der Volhardschen Methode. Die dazu nötigen Reagentien sind:

1. Eine $\frac{1}{10}$ Normallösung von Silbernitrat. Man löse nach Lüttke 17,5 g AgNO_3 in 900 ccm 25prozentiger Salpetersäure und füge 50 ccm Liquor ferri sulfurici oxydati hinzu. Dann fülle man auf 1 Liter auf. 10 ccm dieser Flüssigkeit müssen 10 ccm einer $\frac{1}{20}$ Normalsalzsäure entsprechen, so daß nach dem Mischen beider weder durch HCl noch durch die Silberlösung ein Niederschlag erfolgt.

2. $\frac{1}{10}$ Normalrhodanammoniumlösung. Man löse 7,6 g Rhodanamon in einem Liter destillierten Wassers. Dann stellt man mit der Silberlösung ein. Ein Überschuß von Rhodanamon gibt mit dem Eisensalz eine rote Färbung, die als Indikator dient.

Ausführung der Methode.

10 ccm unfiltrierter Magensaft werden in einem kleinen Meßzylinder abgemessen und sorgfältig in einen Meßzylinder von 100 ccm gespült. Dann setzt man 20 ccm der Silberlösung zu und füllt auf 100 auf.

Ist der Magensaft stark gefärbt, so fügt man nach dem Zusatz der Silberlösung einige Tropfen Permanganatlösung zu.

Dann filtriert man durch ein trockenes Filter in einen trockenen Meßzylinder und titriert nun 50 ccm dieses Filtrates mit Rhodanammonlösung zurück bis zur schwachen Rotfärbung. Dadurch findet man, wieviel überschüssiges Silbernitrat in der Lösung war, und daraus also die Menge des zur Bindung des HCl verbrauchten Silbernitrats, d. h. das Äquivalent des Gesamtchlors des Magensaftes.

Man multipliziert die Anzahl Kubikzentimeter der Rhodanammonlösung (v) mit 2^1), zieht diese von 20^2) ab und multipliziert mit 0,00355. (Gesamtchlor). $\text{Cl} = (20 - 2v) \times 0,0355$.

In einer anderen Probe bestimmt man das anorganisch gebundene Chlor. 10 ccm Magensaft werden auf dem Wasserbade in einer Platinschale eingedampft, dann vorsichtig gegläht, bis die Flammenbildung verschwunden ist. Dazu zerreibt man die Kohle, kocht mehrfach mit destilliertem Wasser aus, sammelt die Filtrate, versetzt mit 10 ccm Normalsilberlösung, schüttelt gut um und titriert mit Rhodanamon zurück, zieht die gefundene Menge von 10 ab und multipliziert mit 0,00355.

Die Differenz beider gefundenen Chlorwerte (Gesamtchlor — anorganisches Chlor) ist gleich der Gesamtsalzsäure (gebundene + freie). Bestimmt man nun noch nach Mintz die freie Salzsäure, so hat man die „gebundene“, d. h. physiologisch in Tätigkeit getretene Salzsäure.

4. Bestimmung der Gesamtsäure.

Die von Leo angegebene Methode zur Bestimmung der Gesamtsäure beruht auf dem Prinzip, daß alle Säuren durch Kalziumkarbonat

¹) Weil man nur 50 von den 100 ccm verarbeitet hat.

²) Die Menge des zugesetzten Silbernitrats.

neutralisiert werden, während saure Phosphate und andere alkali-bindende Substanzen sich gegen dieses Salz indifferent verhalten. Die Methode besteht darin, daß man einen Teil des Saftes direkt, den anderen nach Fällung mit Kalziumkarbonat titriert.

10 ccm Magensaft werden mit konzentrierter Chlorkalziumlösung versetzt und mit $\frac{1}{10}$ Normalalkalilauge unter Zusatz von Phenolphthalein als Indikator titriert. Andererseits versetzt man 10 ccm Magensaft mit 1 g Kalziumkarbonat, treibt die Kohlensäure aus dem Filtrat durch einen Luftstrom aus, fügt zu 10 ccm desselben 5 ccm Chlorkalziumlösung und titriert wie oben. Die Differenz beider Resultate gibt die der Gesamtsäure entsprechende Azidität an.

Sind keine Milchsäure und flüchtige Fettsäuren vorhanden, so bezieht man das Resultat auf Gesamtsalzsäure.

3. Flüchtige Fettsäuren.

Die Gegenwart flüchtiger Fettsäuren läßt sich meist durch den Geruch erkennen. Schüttelt man den Magensaft wiederholt mit größeren Mengen reinen Äthers aus, läßt diesen verdunsten, so bleibt ein sauer reagierender, flüssiger Rückstand von dem charakteristischen Geruch der Buttersäure oder Essigsäure.

Erwärmt man den zu prüfenden Magensaft in einem Reagenzglas und taucht in das Reagenzglas ein angefeuchtetes Stückchen blaues Lackmuspapier ein, so rötet es sich sofort, falls flüchtige Säuren zugegen sind.

Man destilliert den Mageninhalt und untersucht das Destillat in folgender Weise:

a) Ameisensäure. Auf Zusatz von Silbernitrat gibt das Destillat in Gegenwart von Ameisensäure eine rasch sich schwärzende Fällung.

b) Essigsäure. Das mit Natriumkarbonat neutralisierte Destillat gibt 1. auf Zusatz von einem Tropfen verdünnter Eisenchloridlösung eine blutrote Färbung und scheidet beim Kochen von einem braunen Niederschlag von basisch essigsaurem Eisenoxyd aus, oder 2. beim Erwärmen mit konzentrierter Schwefelsäure und Alkohol den Geruch des sich gebildeten Essigäthers.

c) Buttersäure. Fügt man zum Destillat ein Stückchen Chlorkalzium zu, so scheidet sich die nach Schweiß charakteristisch riechende Buttersäure in Form von öligen Tröpfchen aus.

4. Nachweis von Milchsäure.

Der Nachweis der Milchsäure im Magensaft beruht nach Uffelmann darauf, daß, wenn man den zu prüfenden Saft mit einer frisch hergestellten Eisenchloridlösung (1:50) versetzt, deren kaum noch merkliche Färbung in eine kanariengelbe übergeht.

Da aber Alkohol, Zucker, Phosphate diese Reaktion auch geben, verfährt man derart, daß man die Milchsäure zuerst isoliert. Zu diesem Zwecke schüttelt man 5—10 ccm Magensaft, am besten in Posners Schütteltrichter, mit der sechsfachen Menge alkoholfreiem Äther kräftig durch, läßt den abgegossenen Äther verdunsten und prüft den in Wasser aufgenommenen Rückstand in folgender Weise: Die wässrige Lösung wird mit einigen Tropfen des blauvioletten Uffelmannschen Reagens (einige Tropfen einer 5prozentigen Eisenchloridlösung in 30 ccm einer 1prozentigen Karbollösung) versetzt, wobei die amethystblaue Farbe in ein Zeisig- oder Zitronengelb übergeht.

Methode von Boas.

Sehr schön, aber etwas umständlich ist die Boassche Methode. Man dampft den unfiltrierten Magensaft mit überschüssigem Bariumkarbonat zur Sirupkonsistenz ein (eine Messerspitze genügt meist!), schlemmt mit wenig heißem Wasser auf, setzt 5 ccm Phosphorsäure

zu, kocht $\frac{1}{4}$ Stunde, läßt erkalten und extrahiert nun drei- bis viermal mit je 50 ccm reinem Äther im Scheidetrichter. Man trennt die Flüssigkeitsschichten, verdunstet den Äther, nimmt mit heißem Wasser auf, setzt 5 ccm Schwefelsäure und eine Messerspitze Braunstein zu und destilliert aus einem Kölbchen mit langem Glasrohr in alkalische Jodlösung hinein. Beim ersten Aufkochen zeigt sich in der Vorlage Jodoformreaktion (Geruch und gelber Niederschlag). Milchsäure wird nämlich durch Braunstein und Schwefelsäure (Oxydation) in Azetaldehyd gespalten:



Dieser destilliert leicht über und gibt mit Jod Jodoform.

Verwendet man Normaljodlösung und titriert mit Natriumarsenit zurück, so kann man damit die Milchsäure quantitativ bestimmen.

5. Azeton.

Azeton ist im Magensaft häufig durch den Geruch nachweisbar.

Sonst kann man ebenso verfahren wie beim Harn, indem man den Magensaft destilliert und mit dem Destillat die Azetonproben vornimmt.

6. Eiweiß.

Die Eiweißstoffe werden mit denselben Methoden nachgewiesen wie beim Harn. Hat man die Eiweißkörper durch Koagulation entfernt, so kann man auf

Peptone mittels Kupfersulfat und Natronlauge (Biuretreaktion) prüfen.

Man erwärmt den Magensaft auf 80° , filtriert, macht mit Kalilauge stark alkalisch und setzt 3—5 Tropfen 5prozentiger Kupfer-sulfatlösung zu. Eine schon in der Kälte eintretende Violettfärbung beweist das Vorhandensein von Peptonen.

7. Kohlehydrate.

Gärungsvorgänge im Magen weist man mit Hilfe eines Gärungs-röhrchens nach wie beim Zuckerharn (s. Harn).

Stärke soll bereits eine Stunde nach beendiger Mahlzeit verschwunden sein, ebenso ihr Abbauprodukt, das Erythrodextrin. Man setzt zu dem filtrierten Magensaft Tropfen für Tropfen einer sehr verdünnten Jod-Jodkalium-lösung (Lugol-Lösung). Mit dem Jodzusatz muß man sehr vorsichtig sein, weil ein zu rascher und zu großer Jodzusatz beim fast ständigen Vorhandensein löslicher Stärke stets und sofort eine Blaufärbung gibt. Das eventuell vorhandene Erythrodextrin hat eine größere Affinität zum Jod als das Amylodextrin und färbt sich also in erster Linie. Auftretende Blaufärbung deutet auf gelöstes Amylum (stark verzögerte Amylumverdauung) hin, Purpurfärbung zeigt Erythrodextrin (an verzögerte Amylumverdauung). Bleibt aber die Flüssigkeit schwach gelb gefärbt, so ist die Bildung von Achroodextrin, Maltose und Traubenzucker bewiesen (normale Stärkeverdauung).

Zucker wird nach Entfernung der Eiweißstoffe nach den üblichen Methoden nachgewiesen.

8. Gallenfarbstoff.

Gallenfarbstoff wird bei alkalischer Reaktion des Mageninhaltes direkt im filtrierten Magensaft, ebenso wie im Harn nachgewiesen (s. diesen):

reagiert der Mageninhalte sauer, so wird mit Alkali schwach alkalisch gemacht und das Filtrat geprüft.

9. Schwefelwasserstoff.

Schwefelwasserstoff ist in vereinzelten Fällen im Magensaft gefunden worden. Man erkennt ihn am Geruch oder indem man den Magensaft in eine Flasche tut, verkorkt und zwischen Kork und Glas ein Stück mit Bleiessig befeuchtetes Filtrierpapier bringt. Dies wird durch Schwefelwasserstoff braun bis schwarz gefärbt.

10. Pepsin.

Eigenschaften. Das Pepsin stellt ein farbloses Pulver dar, das in Wasser wenig, in verdünnter Kochsalzlösung leicht löslich ist; es löst sich in 0,2prozentiger Salzsäure bei Körpertemperatur leicht auf. Es gibt die Eiweißreaktionen, zeigt Linksdrehung und wird durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat aus seinen Lösungen gefällt. Bei schnellem Erhitzen gerinnt seine saure Lösung, bei 60° C wird sie trübe; bei langsamem Erhitzen bis zur Siedetemperatur bleibt die Lösung völlig klar.

Nachweis. Bei Gegenwart von freier Salzsäure kann man Pepsin leicht dadurch nachweisen, daß man zum filtrierten Mageninhalte ein Flöckchen Fibrin bringt und im Brutschrank oder 40° warmen Wasserbad $\frac{1}{2}$ Stunde oder bei gewöhnlicher Temperatur etwa 2 Stunden stehen läßt, wobei man nie unterlassen darf, eine Kontrollprobe mit Säure allein und einer anderen Portion desselben Fibrins anzustellen. Bei Anwesenheit von Pepsin wird das Fibrin gelöst.

Bei Abwesenheit von Salzsäure prüft man auf Pepsinogen derart, daß man mit HCl ansäuert und dann auf Pepsin prüft.

Jacoby weist Pepsin in der Weise nach, daß er eine Lösung von 1 g Rizin und 1,5 g Kochsalz in 100 Teilen Wasser benutzt, die stets trübe aussieht, auch bei Zusatz der geringen Menge Salzsäure, die man bei Pepsinversuchen anzuwenden pflegt. Dagegen hellt sich die Lösung schon bei Zusatz äußerst geringer Mengen wirksamen Pepsins, bis 0,001 herunter, auf.

Darstellung. Das Pepsinogen oder Propepsin stellt man nach Glaessner¹⁾ dar, indem man die gereinigte, feinzerhackte Schleimhaut vom Schweinemagen mit der doppelten Menge Wasser versetzt und nach Zufügen von Soda bis zur deutlich alkalischen Reaktion und von Toluol 3—4 Wochen bei 40° C stehen läßt. Hierauf filtriert man, versetzt das Filtrat mit Kochsalz bis zu 1 Proz., fügt Essigsäure hinzu, filtriert, versetzt mit Soda bis zur schwach alkalischen Reaktion und fällt mit Uranylacetat. Der die Vorstufen des Pepsins und Labs enthaltende Niederschlag wird zentrifugiert, mit kleinen Mengen sodahaltigen Wassers ausgezogen und Fällung und Extraktion wiederholt. Hierauf engt man die Auszüge bei 40° C ein, versetzt mit Natriumphosphat und Uranylacetat, wodurch das Propepsin ausfällt und das Prochymosin in Lösung bleibt. Der Niederschlag wird mit schwach alkalischem Wasser ausgezogen, und man erhält eine gegen Eiweißstoffe unwirksame Lösung, die aber auf Zusatz von verdünnter Salzsäure durch Umwandlung des Propepsins in Pepsin wirksam wird. Diese Lösung ist gegen Soda bis zu 0,5 Proz. widerstandsfähig, während Pepsin bei derselben Konzentration zerstört wird.

Zur Darstellung des Pepsins verfährt Pikelharing²⁾ in der

¹⁾ Glaessner, Über die Vorstufen der Magenfermente. Hofmeisters Beiträge 1, 1, (1901).

²⁾ Pikelharing, Über eine neue Bereitung des Pepsins. Zeitschr. f. physiol. Chemie 22, 233 (1896/97); Mitteilungen über Pepsin. Zeitschr. f. physiol. Chemie 35, 8 (1902).

Weise, daß er den nach Pawlow gewonnenen, filtrierten, farblosen Hundemagensaft etwa 20 Stunden lang bei einer etwas über 0° C liegenden Temperatur dialysiert, die trübe Flüssigkeit zentrifugiert, den größten Teil der Flüssigkeit dekantiert, den Niederschlag auf einen Filter bringt, mit Wasser nachwäscht und im Exsikkator trocknet. Die Mutterlauge sättigt er halb mit Ammoniumsulfat, dialysiert den entstandenen Niederschlag, um das Salz zu entfernen, löst ihn bei 37° C in möglichst wenig 0,2prozentiger Salzsäure, dialysiert die filtrierte Lösung und verfährt weiter, wie oben angegeben, wodurch man ein reineres, vollkommen von phosphorhaltigen Beimengungen freies Pepsinpräparat erhält.

Zur Darstellung eines künstlichen Magensaftes wäscht man die abpräparierte Schleimhaut des Fundusteiles eines Schweine-, Kalbmagens mit Wasser, zerschneidet sie in kleine Stücke und extrahiert in der Kälte und unter öfterem Umrühren einige Stunden mit verdünnter Salzsäure (4—8 ccm rauchende Salzsäure auf 1 Liter Wasser). Auf diese Weise erhaltene Verdauungsflüssigkeit ist sehr wirksam, hält sich aber nur einige Tage, dagegen ist ein Glyzerinauszug der Magenschleimhaut bedeutend haltbarer. Versetzt man den Glyzerinauszug mit Alkohol, so erhält man ein unreines, aber sehr wirksames Ferment. Auch 0,2 g käufliches Pepsin in 500 ccm einer 0,2—0,3prozentigen Salzsäure gibt eine gute Verdauungsflüssigkeit.

Quantitative Bestimmung. Methode von Mett. Man füllt Glasröhrchen von 1—2 mm lichter Weite und 20—25 cm Länge durch Aufsaugen mit flüssigem Hühnereiweiß, erwärmt sie in einem Wasserbade auf 95° C, bis Koagulation stattgefunden hat, worauf man sie in Stückchen von 1—2 cm Länge zerschneidet. Hierauf bringt man die Glasröhrchen in den zu prüfenden Magensaft, den man etwa 10 Stunden im Brutofen stehen läßt. Nun mißt man mit Hilfe einer Lupe und eines Meßinstrumentes die Länge der verdauten Eiweißsäule in Millimetern und berechnet die Pepsinkonzentration entsprechend dem Schütz-Borissowschen Gesetz, nach dem sich die Pepsinmengen wie die Quadrate der Millimeter der verdauten Eiweißsäulen verhalten, durch Quadrierung der Länge der verdauten Eiweißsäulen.

Die Fuldsche Methode beruht auf dem Prinzip, daß eine saure Lösung von Edestin durch Neutralisation oder Zusatz von Neutralsalz gefällt wird, seine peptischen Verdauungsprodukte nicht.

Erforderliche Reagenzien: Edestin aus Hanfsamen, Salzsäure von der Azidität 30 (30 Teile $\frac{1}{10}$ Säure auf 70 Wasser), Kochsalzlösung 30 : 100.

Ausführung: Eine Reihe von Reagenzgläsern wird mit fallenden Quantitäten des auf seinen Pepsingehalt zu prüfenden Saftes, sowie eventuell seiner Verdünnungen (angefertigt mittels der beschriebenen Salzsäure) beschickt. In jedes Glas kommen dann 2 ccm einer Auflösung von 1 Teil Edestin in 1000 Teilen Salzsäure (s. oben). Digestion während einer $\frac{1}{2}$ Stunde bei Zimmertemperatur. Alsdann

Zusatz von 0,3 ccm Kochsalzlösung. Ausbleiben der Trübung beweist vollkommene Verdauung. Aus der mindestens hierzu erforderlichen Saftmenge berechnet sich der Pepsingehalt der geprüften Lösung.

Berechnung. Wenn beispielsweise ein Magensaft aufs Zwanzigfache verdünnt in einer Menge von 0,4 ccm nach der Digestion keine Trübung mehr zustande kommen läßt, wohl aber noch in der nächst schwächeren Probe bei einer Menge von 0,25, so ist der Saft mindestens 100fach und schwächer als 160fach; je nach der Stärke der Trübung im letzteren Glas kann man urteilen, ob die erste oder die letzte Zahl dem wahren Wert näher kommt. Die Zahl erhält man durch Multiplikation der Menge Edestinlösung mit der Verdünnungszahl des Saftes geteilt durch dessen Menge $\frac{2,20}{0,4} = 100$.

Methode von Volhard-Löhlein ¹⁾. Die Methode beruht auf der Tatsache, daß, wenn man Kasein in Salzsäure löst und es durch Natriumsulfat aus dieser Lösung fällt, das Filtrat eine bestimmte Menge Salzsäure enthält. Wird ein Teil des Kaseins verdaut, so nimmt die Menge Salzsäure im Filtrat zu, und diese Zunahme an Salzsäure im Filtrat geht parallel mit der Pepsinmenge, sie verhält sich wie die Quadratwurzeln aus der Fermentmenge und der Verdauungszeit.

Man suspendiert 100 g Kasein in 1 Liter Wasser, fügt 80 ccm $\frac{1}{10}$ Normallauge hinzu, füllt auf 2000 ccm auf, schüttelt gut durch und erhitzt bis zur vollständigen Lösung. In die mit Marken versehene Verdauungsflasche bringt man 11 ccm $\frac{1}{10}$ Normalsalzsäure, füllt auf 150 ccm auf, setzt 100 ccm Kaseinlösung und eine gemessene Menge Magensaft hinzu, füllt auf 300 ccm auf, stellt die Verdauungsflasche in den Brutschrank auf 1 Stunde und versetzt dann mit 100 ccm einer 20prozentigen Natriumsulfatlösung. Hierauf filtriert man, titriert mit $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge und Phenolphthalein als Indikator und zieht von dem gefundenen Wert die Azidität der Stammlösung ab; außerdem zieht man auch die Azidität des zugesetzten Magensaftes ab.

Methode von Groß ²⁾. Der Autor benutzt die Eigenschaft des Kaseins, aus saurer Lösung durch Natriumazetat gefällt zu werden, während seine Abbauprodukte in Lösung bleiben, zur quantitativen Bestimmung, indem 1 g Kasein Grubler mit 16 ccm einer 25prozentigen Salzsäure im Liter Wasser auf dem Wasserbade bis zur Lösung erwärmt. Je 10 ccm dieser auf 39–40° C vorgewärmten Lösung kommen in eine Reihe von Reagenzgläsern, die mit steigenden Mengen des zu untersuchenden Magensaftes beschickt und auf 15 Minuten in den Brutschrank gestellt werden. Hierauf werden einem jeden Gläschen einige Tropfen einer konzentrierten Lösung von Natriumazetat zugesetzt. Das unverdaute Kasein fällt dabei aus, und man kann auf solche Weise die geringste Menge von Magensaft, die in 15 Minuten alles Kasein verdaut hat, erkennen. Als Einheit gilt die verdauende Kraft der Saftmenge, die in 15 Minuten 10 ccm der Kaseinlösung

¹⁾ F. Volhard, Münchner mediz. Wochenschr. 1903, 49. — Löhlein, Über die Volhardsche Methode der quantitativen Pepsin- und Trypsinbestimmung durch Titration. Hofmeisters Beiträge 7, 120 (1905).

²⁾ O. Groß, Die Wirksamkeit des Pepsins und Trypsins, eine einfache Methode zu ihrer Bestimmung. Berliner klin. Wochenschr. 45, 643, (1908).

= 0,01 g Kasein so verdaut, daß auf Zusatz von Natriumazetatlösung keine Trübung mehr auftritt.

11. Labferment (Chymosin).

Zu 10 ccm neutral oder amphoter reagierender ungekochter kalter Milch setzt man 3—5 Tropfen genau neutralisierten und filtrierten Magensaft hinzu und läßt bei 35—40° C stehen. Eine binnen 15 Minuten eintretende Kaseinabscheidung beweist Labferment. Die Reaktion muß auch nach der Gerinnung neutral sein, da letztere auch durch entstandene Säuren erfolgt sein könnte. Findet keine Gerinnung statt, so säuert man die Lösung mit $\frac{1}{10}$ Normalsalzsäure schwach an, versetzt die Milch mit einigen Tropfen 1prozentiger Chlorkalziumlösung und bringt sie mit der Lösung zusammen. In Gegenwart von Labzymogen tritt Gerinnung ein.

Darstellung. Man zieht die Magenschleimhaut vom Kalb mit 0,3prozentiger Salzsäure aus, sättigt den Auszug mit Magnesiumkarbonat, schüttelt dann mit überschüssigem Magnesiumkarbonat, filtriert, fällt mit basischem Bleiazetat und zerlegt den Niederschlag mit sehr verdünnter Schwefelsäure. Fügt man zu dieser schwach sauren Lösung wässrige Stearinseifenlösung, filtriert, suspendiert den Niederschlag in Wasser und schüttelt mit Äther, so löst sich die Stearinsäure im Äther, und das Lab bleibt im Wasser gelöst.

Quantitative Bestimmung. Eine quantitative Schätzung des Labferments wird so ausgeführt, daß man durch fortdauernde Verdünnung erst in schwach saurer Lösung die untere Grenze der Labwirkung, dann in schwach alkalischer, weiterhin die des Zymogens bestimmt. Normalerweise soll die Schwelle bei Lab bei 30—40facher, beim Zymogen bei 100—150facher Verdünnung liegen (Boas).

Methode von Morgenroth¹⁾. Man füllt eine Reihe von Reagenzgläsern mit absteigenden Mengen Magensaft, fügt zu jeder Portion 10 ccm Magermilch, schüttelt durch und läßt sie im Eisschrank 24 Stunden stehen. Hierauf bringt man die Reagenzgläser in ein Wasserbad von 32° C und läßt sie 5 Min. stehen und stellt dann fest, in welchen dieser Reagenzgläser eine komplette und in welchem eine partielle Gerinnung stattgefunden hat.

Methode von Blum und Fuld²⁾. Die Autoren verwenden an Stelle der in ihrer Labfähigkeit stark variierenden Marktmilch ein Milchpulver von konstanter Zusammensetzung, indem sie 3 g von diesem Pulver mit dem neunfachen Gewicht Wasser unter fortwährendem Umrühren 1 Minute lang auf 80° C erwärmen und nach dem Erkalten auf einen Chlorkalziumgehalt von 4 Promille bringen.

Der filtrierte Magensaft wird auf eine Reihe von Reagenzgläsern in absteigender Menge verteilt, zu jeder Portion 5 ccm der Milchlösung zugefügt, bei einer konstanten Temperatur von 15° C 2 Stunden stehen gelassen, dann auf 5 Minuten in ein Wasserbad von 37° C ge-

¹⁾ J. Morgenroth, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasit. und Infekt. 26, 349 (1899).

²⁾ L. Blum und E. Fuld, Über eine neue Methode der Labbestimmung und über das Verhalten des menschlichen Magenlaba unter normalen und pathologischen Zuständen. Berliner klin. Wochenschr. 1905, Nr. 44 a, 107.

bracht und festgestellt, in welchem Gläschen noch ein Gerinnsel vorhanden ist. Die niedrigste noch wirksame Verdünnung gibt das Maß für die Labmenge. Als normal werden Werte von 3000—7000 angesehen. Für reinen Hundemagensaft schwanken die Werte nach Blum und Boehme zwischen 1000 und 6000.

12. Lipase.

Zum Nachweis der Fettspaltung verfährt Volhard ¹⁾, indem er 10 ccm einer aus drei Eigelb und 100 ccm Wasser bereiteten Emulsion mit 5 ccm Magensaft resp. Mageninhaltfiltrat bei Brutschrank- oder Zimmertemperatur 6—12 Stunden digeriert. Hierauf extrahiert er das Gemisch mit Äther und bestimmt in einem aliquoten Teil des Extraktes unter Zusatz der gleichen Menge säurefreien Alkohols die Säure durch Titration mit $\frac{1}{10}$ Normallauge unter Benutzung von Phenolphthalein als Indikator. Ein anderer Teil des Ätherextraktes wird mit 10 ccm $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge versetzt und 24 Stunden stehen gelassen, wobei Verseifung stattfindet. Die Fettsäuren werden dann durch 10 ccm Normalschwefelsäure in Freiheit gesetzt und die Menge durch Titration mit $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge bestimmt.

13. Blut im Mageninhalt.

Man weist das Blut mittels der Hellerschen Probe nach. Man versetzt den Mageninhalt mit dem gleichen Volumen normalen Harns, um ihm die Phosphate zuzuführen, die dann bei der Alkalisierung ausfallen und den Blutfarbstoff mitreißen.

Meist ist das Blut durch die Einwirkung der freien Säuren des Magensaftes in eine kaffeesatzartige Masse verwandelt, die Hämatin enthält. Zum Nachweis löst man die Masse in etwas Soda oder Natronlauge, filtriert, versetzt mit Schwefelammonium und prüft mit dem Spektroskop auf Hämochromogen.

Finden sich im Erbrochenen auch andere aus den Speisen herrührende Farbstoffe oder Galle, so erwärmt man die Flüssigkeit mit etwas verdünnter Salpetersäure und filtriert, wodurch diese Stoffe entfernt werden. Der Niederschlag wird, wie oben angegeben, behandelt.

14. Darmsaft.

Der Darmsaft stellt eine dünn- oder mehr dickflüssige schleimige, gallertähnliche, gegen Lackmus alkalisch reagierende Flüssigkeit dar und ist mit mehr oder weniger gallertähnlichen Klümpchen und Flöckchen durchsetzt; entwickelt auf Säurezusatz Kohlensäure.

Erepsin. Zur Isolierung des Erepsins versetzt man nach Cohnheim ²⁾ 2 Teile eines wässrigen Auszuges der Schleimhaut des Hundedarms mit 3 Teilen gesättigter Ammoniumsulfatlösung, filtriert vom Niederschlag ab, suspendiert ihn in Wasser, dialysiert und filtriert; im Filtrat befindet sich das Ferment.

Zum Nachweis des Erepsins versetzt man 10 ccm Darmsaft mit 5 ccm einer Peptonlösung und etwas Chloroform oder Toluol und prüft nach 24—48stündigem Stehen im Brutschrank mit der Biuretreaktion

¹⁾ F. Volhard, Münchner mediz. Wochenschr. 1900, 141 u. 194; Zeitschr. f. klin. Medizin 42, 414 (1901).

²⁾ O. Cohnheim, Zeitschr. f. physiol. Chemie 33, 451 (1901).

— ein Schwächerwerden der Reaktion beweist die Gegenwart von Erepsin.

Nuklease. Wohlgemuth und Wakabayashi ¹⁾ weisen die Nuklease in folgender Weise nach. 5 ccm Darmsaft werden mit einer Lösung von 1,0—0,5 g thymonukleinsaurem Natrium in 10 ccm Wasser und etwas Toluol versetzt und im Brutschrank 24—48 Stunden stehen gelassen. Dann kocht man auf, engt ein, filtriert und fällt aus dem Filtrat die Nukleinsäure mit Alkohol und Natriumazetat aus. Das Filtrat wird nach dem Verdunsten des Alkohols mit Ammoniak versetzt, abermals filtriert, die Purinbasen mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt, abfiltriert, ausgewaschen, mit Salzsäure zersetzt, die Lösung eingeeengt und die freien Basen mittels der Diazoreaktion nachgewiesen.

Diastase. Der Nachweis geschieht nach der Methode von Wohlgemuth (s. Speichel).

Invertase. Man weist die Invertase nach, indem man den zu untersuchenden Darmsaft mit 5 Proz. Rohrzucker versetzt und nach Zusatz von Toluol in den Brutschrank gestellt. Fällt in einer entnommenen Probe die Trommersche Reaktion positiv aus, so ist damit die Spaltung des Rohrzuckers und die Gegenwart von Invertase bewiesen.

Maltase. Der Nachweis der Maltase erfolgt in derselben Weise wie beim Speichel.

Laktase. Man versetzt den Darmsaft oder den Dünndarmextrakt mit Milchzucker, fügt etwas Chloroform oder Toluol hinzu und stellt in den Brutschrank. Ändert sich die Drehung, so ist Glukose abgespalten.

15. Pankreassaft.

Diastase. Verfügt man nicht über natürlichen Pankreassaft, so kann man den Saft aus der Drüse durch Infusion mit Wasser oder Glycerin gewinnen. Das Infus oder das mit Wasser verdünnte Glycerinextrakt kann direkt mit Kleister geprüft werden. Sicherer ist es jedoch, das Enzym mit Alkohol erst aus dem Glycerinextrakt auszufällen und den mit Alkohol ausgewaschenen, über Schwefelsäure getrockneten Niederschlag mit Wasser zu extrahieren, wobei das Enzym in Lösung geht. Sein Nachweis geschieht am besten nach der Methode von Wohlgemuth (s. Speichel).

Den Nachweis der fettsplattendenden Wirkung führt man herbei, indem man Olivenöl mit Natronlauge und Äther schüttelt, die Ätherschicht abhebt, die Ätherschicht wiederholt mit Wasser wäscht und den Äther bei gelinder Wärme verjagt, wobei man ein vollständig neutrales, von Fettsäuren freies Fett, das Alkanatinktur nicht färbt, erhält. Wird nun dieses Fett mit ganz frischem Pankreassaft oder mit einem frisch bereiteten, mit etwas Kalilauge versetztem Infus der

¹⁾ J. Wohlgemuth und T. Wakabayashi, Bickels internat. Beiträge 2, 519 (1911).

ganz frischen Drüse oder mit dem schwach alkalischen Glycerin-extrakt (8 Teile Glycerin und 1 Teil einer 1prozentigen SodaaLösung auf 1 g Drüse) gemischt, etwas Lackmusträktur hinzugesetzt und auf 37° C erwärmt, so beobachtet man eine allmähliche Abnahme der alkalischen Reaktion, die zuletzt in eine saure umschlägt, weil das Neutralfett von dem Enzym in Glycerin und freie Fettsäuren gespalten wird.

Die Spaltung des Neutralfettes läßt sich exakter nachweisen, wenn man das bei Körpertemperatur digerierte Gemenge von Neutralfett und Pankreassaft mit etwas Soda digeriert und wiederholt mit neuen Mengen Äther ausschüttelt, bis alles Neutralfett ausgezogen ist. Die Flüssigkeit wird darauf mit Schwefelsäure angesäuert, dann mit Äther ausgeschüttelt, der Äther verjagt und der Rückstand auf Fettsäuren untersucht.

Trypsin. Das Trypsin löst sich in Wasser und Glycerin. Gegen Wärme ist es empfindlich und wird schon bei Körpertemperatur zersetzt, in neutraler Lösung wird es bei + 45° C unwirksam gemacht. Vom Magensaft und schon von Verdauungssalzsäure wird es allmählich vernichtet.

Darstellung. Man stellt nach Kühne ¹⁾ das Trypsin dar, indem man frisches Pankreas noch warm mit Glaspulver und absolutem Alkohol zerreibt, den Niederschlag mit kaltem Wasser behandelt, die Lösung mit Alkohol fällt, Lösung und Fällung wiederholt und den Niederschlag mit absolutem Alkohol behandelt, wobei ein Niederschlag entsteht. Dieser wird nun in Wasser gelöst, die Lösung mit Essigsäure bis zu 1 Proc. versetzt, filtriert, das Filtrat einige Zeit auf 40° C erwärmt, filtriert, erwärmt und versetzt mit Alkali bis zur deutlich alkalischen Reaktion. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert, das Filtrat bei 40° C eingedampft, wobei sich Tyrosin abscheidet, hierauf dialysiert, um Pepton, Leucin und andere Stoffe zu entfernen. Das zurückbleibende Trypsin wird durch wiederholte Fällung mit Alkohol gereinigt.

Kühne hat auch ein sehr wirksames und haltbares, aber unreines Präparat, das Trockenpankreas, dargestellt, indem er die Drüse nach 24stündigem Liegen an der Luft rein präparierte, zerkleinerte, mit absolutem Alkohol vom Wasser befreite, mit Äther extrahierte, zerrieb und durch ein feines Sieb gehen ließ. 0,2 g dieses Pulvers in 500 ccm einer 0,5prozentigen SodaaLösung liefert eine gute Verdauungsflüssigkeit.

Sehr wirksame und lange Zeit haltbare Lösungen erhielt durch Extraktion mit Glycerin Heidenhain. Eine stark wirkende, aber unreine Infusion erhält man nach Salkowski, wenn man die fein zerschnitten Drüse nach 24stündigem Liegen an der Luft bei Körpertemperatur einige Tage mit Chloroform- oder Toluolwasser extrahiert

¹⁾ Kühne, Verhandl. der naturh. mediz. Ver. zu Heidelberg, N. F. 1. 194 (1876).

und das Filtrat mit 0,5 Proz. Natriumkarbonat versetzt. Solche Jabsen im Keller aufbewahrt, können noch nach mehreren Jahren sehr wirksam sein. Zu Versuchsversuchen kann man auch gut wirkende käufliche Präparate benutzen.

Nachweise. Den Nachweis des Trypsins führt man in der Weise herbei, daß man gut ausgewaschen und ausgewaschenes Fleisch in 70% der tryptischen Verdauungsmischung bringt, füllt zur Vermeidung des Fäulnis-Geschmackes mit Toluol hinzu und stellt die Köcher in die Reibschalen, wobei das Fleisch von dem Trypsin gelöst wird, die Flüssigkeit durch nicht wasserlösliche Stoffe nach Bromstein. Es ist jedoch nötig, eine eine Kontrollprobe mit Fleisch allein, mit oder ohne Ansaurensatz anzusetzen. Da das Trypsin auch andere Proteinkonzentrat z. B. Leim, verdaut, so kann man zum Nachweis des Trypsins auch Leim verwenden. Die Verdauung von geschlitztem Gelatine ist auch ein sehr charakteristisches Reagens auf Trypsin und tryptische Bakterien.

Quantitative Bestimmung. Groß¹⁾ hat folgendes Verfahren angegeben. Je 10 ccm der 1prozentigen Kaseinlösung wird mit steigenden Mengen Fermentlösung im Thermostaten verdaut, dann zu jedem Röhrchen mehrere Tropfen 1prozentiger Essigsäure zugesetzt. Die Röhrchen, in denen alles verdaut ist, bleiben klar, während in den übrigen Trübung auftritt. (Kaseres + bei Pepsin.)

Die von Fold angegebene Methode unterscheidet sich von der Grobschen dadurch, daß statt wässriger Essigsäure eine 50prozentige alkoholische benutzt wird.

Methode von Lohlelo²⁾. Bei der Bestimmung des Trypsins ist das Vorgehen genau das gleiche wie beim Pepsin, mit dem Unterschiede, daß man die 11 ccm Salzsäure erst nach der Digestion dem Verdauungsgemisch zufügt.

Lohlelo fand bei seinen Versuchen über das Zeitgesetz des Trypsins nicht die schärfste Wurzelregel, sondern die Anzahlatznahmen verhielten sich direkt wie die Fermentmengen und Verdauungszeiten. Während also für die gesuchte Pepsinkonzentration $x = \frac{v^2}{f \cdot t}$ gefunden wurde, gilt für die Trypsinkonzentration bei Anwendung der Volhardschen Methode die Regel $x = \frac{v}{f \cdot t}$. Als Pepsineinheit oder Trypsineinheit bezeichnet Volhard die Menge Ferment, die in 1 Stunde 1 ccm Ansaurenschwache liefert, d. h. den Fall, in dem $\frac{v^2}{f \cdot t}$ bzw. für

$$\text{Trypsin } \frac{v}{f \cdot t} = 1 \text{ ist}$$

L. Die Muskeln.

1. Muskelplasma und Muskelserum.

Diejenige noch gerinnbare Flüssigkeit, die durch Auspressen aus dem lebenden Muskel erhalten wird, nennt man Muskelplasma;

¹⁾ G. Groß, Die Wirksamkeit des Trypsins und eine einfache Methode zu ihrer Bestimmung. Archiv f. experim. Pathol. u. Pharm. 58, 117 (1907).

²⁾ W. Lohlelo, Über die Volhardsche Methode der quantitativen Pepsin- und Trypsinbestimmung durch Thiochin. Hofmeister-Berichte 7, 129 (1906).

diejenige, die man aus totem Muskel erhält, wird Muskelserum genannt.

2. Proteine der quergestreiften Muskeln.

Darstellung des Muskelplasmas. Unmittelbar nach dem Tode des Tieres wird das Blut aus den Muskeln durch Durchleiten einer stark abgekühlten Kochsalzlösung (5 Proz.) ausgewaschen; man zerschneidet rasch die Muskeln, läßt sie durchfrieren, so daß sie in diesem Zustande zu einer feinen Masse, „Muskelschnee“, zerrieben werden können, preßt sie in der Kälte stark ab und erhält auf diese Weise das Muskelplasma.

Eigenschaften des Muskelplasmas. Das Muskelplasma stellt eine, bei verschiedenen Tieren etwas verschieden gelblich bis bräunlich gefärbte Flüssigkeit alkalischer Reaktion dar. Das Muskelplasma des Frosches gerinnt langsam spontan bei etwas über 0° C, rasch bei Körpertemperatur. Das Muskelplasma der Säugetiere gerinnt nach Fürth selbst bei Zimmertemperatur sehr langsam und so spärlich, daß von einer eigentlichen Gerinnung kaum die Rede sein kann. Die Beobachtungen über die Reaktion der Gerinnung sind einander widersprechend: nach Kühne und v. Fürth ist die Reaktion alkalisch, während sie nach Halliburton, Stewart und Sollmann sauer wird.

Die Eiweißstoffe des toten Muskels. Teils sind die Eiweißstoffe in Wasser oder verdünnten Salzlösungen löslich, teils unlöslich. Zu den löslichen gehören das Myosin und Muskulin und in geringen Mengen Myoglobulin und Myoalbumin, zu den löslichen zählen die Stromasubstanzen des Muskelrohres.

3. Myosin.

Eigenschaften. Das Myosin hat die Eigenschaften der Globuline und ist auch in Wasser unlöslich, aber in verdünnten Salzlösungen wie in sehr verdünnten Säuren oder Alkalien, durch die es sehr leicht in Albuminate verwandelt wird, löslich. Durch Sättigung mit Natriumchlorid, sowie durch eine 94prozentige kristallwasserhaltige Magnesiasulfatlösung wird es vollständig gefällt.

Darstellung des Myosins. Der Muskel wird mit 5prozentigem Magnesiasulfat extrahiert, filtriert, das Filtrat mit 50 g Magnesiasulfat auf je 100 ccm Lösung versetzt, wodurch sich das Paramyosinogen, das mit Nasses Muskulin identisch ist, ausscheidet. Das Filtrat vom Paramyosinogen wird mit 9,4 g Magnesiasulfat auf 100 ccm Flüssigkeit versetzt, das sich ausscheidende Myosin wird abfiltriert, in Wasser gelöst, durch Verdünnung mit Wasser gefällt, der Niederschlag in verdünnter Salzlösung gelöst und mit Wasser gefällt (Halliburton).

Nach Danilewsky extrahiert man den Muskel mit 5—10prozentiger Salmiaklösung, filtriert, verdünnt stark das Filtrat mit Wasser, löst das dabei ausgefällte und abfiltrierte Myosin in Salmiaklösung und fällt wiederum durch starke Verdünnung mit Wasser oder durch Entfernung des Salzes mittels Dialyse.

Die Preßflüssigkeit der mit physiologischer Kochsalzlösung blutfrei gemachten Muskeln wird nach v. Fürth der Diffusion unterworfen oder mit $\frac{3}{4}$ Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, der ausgeschiedene Niederschlag mit physiologischer Kochsalzlösung

behandelt, das Filtrat wieder mit $\frac{3}{4}$ Volumen Ammonsulfatlösung versetzt und die Operation noch einmal wiederholt.

Myosinfibrin. Bei längerem Stehen, schneller beim Erwärmen auf 35° C, trübt sich die wässrige Lösung des Myosins aus Muskelplasma, und es bildet sich ein Niederschlag von Myosinfibrin, das in Neutralsalzlösungen unlöslich ist und die Eigenschaften koagulierter Albuminstoffe zeigt.

4. Myogen (Myosinogen von Halliburton).

Eigenschaften. Die Lösungen des Myogens koagulieren beim schnellen Erhitzen zwischen 55—65° C. Durch Kochsalz und Magnesiumsulfat werden sie etwas gefällt, durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat unvollständig, vollkommen aber durch Sättigung mit diesem Salze.

Bei etwas höherer Temperatur, sowie bei Gegenwart von Salz geht Myogen spontan in eine unlösliche Modifikation, das „Myogenfibrin“, über, wobei als Zwischenstufe eine bei 30—40° C gerinnende Substanz, „lösliches Myogenfibrin“, das im nativen Frostmuskelplasma vorhanden ist, genommen wird.

Darstellung. Nach v. Fürth befreit man das zur Darstellung des Myogens dienende dialysierte und filtrierte Muskelplasma durch kurzes Erhitzen auf 52° C von den Resten des Muskulins und fällt mit Alkohol oder versetzt mit $1\frac{1}{4}$ Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung und sättigt das Filtrat mit gepulvertem Ammoniumsulfat. Der mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung ausgewaschene und abgepreßte Niederschlag wird in Wasser gelöst, die Lösung auf 40° C erhitzt, wobei das lösliche Myogenfibrin ausfällt, filtriert und das Filtrat mit Alkohol gefällt.

5. Muskelstroma.

Nach dem vollständigen Entfernen sämtlicher in Wasser und Salmiaklösung löslicher Eiweißkörper des Muskels bleibt ein unlöslicher, in Salmiaklösung nur aufquellender Eiweißkörper zurück, der samt den übrigen unlöslichen Bestandteilen der Muskelfaser das „Muskelstroma“ darstellt. Die Stromasubstanz gehört weder der Nukleoalbumin- noch der Nukleoproteidgruppe an und kann nicht als ein Glykoproteid angesprochen werden, weil sie beim Sieden mit verdünnten Mineralsäuren keine reduzierende Substanz liefert; am meisten ähnelt sie den geronnenen Eiweißkörpern. Sie löst sich in verdünntem Alkali zu Albuminat auf, ihre elementare Zusammensetzung ist der des Myosins sehr ähnlich. Unter den Stromasubstanzen finden sich nach v. Fürth auch die bei der Gerinnung des Plasmas entstehenden unlöslichen Stoffe, das Myofibrin und das Myosinfibrin.

6. Quantitative Bestimmung der Muskelproteine.

Eine Probe von 10 ccm frischen Muskelplasmas wird auf 100° C bis zur vollständigen Koagulation erhitzt, wobei die Gesamtmenge Eiweiß ausfällt.

Beim Erhitzen einer zweiten Probe von 10 ccm während 5 Minuten auf 40° C wird das präformierte, lösliche Myogenfibrin koaguliert.

Erhitzt man nun 10 ccm des Plasmas während 5 Minuten auf 50° C, so scheidet sich Myosin + lösliches Myogenfibrin aus.

Eine auf 70° C erhitzte Plasmaprobe gibt Myosin und das Myogen als unlösliches Myosin- bzw. Myogenfibrin.

Um die Gerinnungsbedingungen gleichmäßig zu gestalten, bringt man die Proben in gleich große Gläschen von gleicher Wandstärke in ein Wasserbad, liest die Temperatur mit einem Thermometer, das sich in einem mit Wasser gefüllten, gleich großen Gläschen befindet. Die Niederschläge werden zentrifugiert, mit destilliertem Wasser dekantiert, durch wiederholtes Zentrifugieren chlorfrei gewaschen, mit Alkohol und Äther behandelt, bei 110° C getrocknet und dann gewogen (Steyrer)¹⁾.

7. Stickstoffhaltige Extraktivstoffe des Muskels.

Die stickstoffhaltigen Extraktivstoffe des Muskels bestehen hauptsächlich aus Kreatin, ferner aus den Purinbasen, Hypoxanthin und Xanthin nebst Guanin und Karnin, ferner im Liebig'schen Fleischextrakte nach Kutscher, Karnosin, Ignotin, Methylguanidin, Oblitin, Karnomuskarin, Neosin, Karnitin, Histidin, Novain, Vitalin.

a) Isolierung von Kreatin, Kreatinin, Karnosin, Methylguanidin, Karnomuskarin, Neosin, Karnitin, Neurin, Cholin, Oblitin, Histidin und Vitalin nach Kutscher²⁾.

Eine Lösung von 450 g Liebig's Fleischextrakt in 210 ccm Wasser wird nötigenfalls mit Phosphorsäure angesäuert und mit einer 20prozentigen Tanninlösung gefällt, wobei eine Probe des Filtrats auf Zusatz von Tanninlösung keine oder eine höchst schwache Trübung zeigen darf. (Dies wird bei Anwendung von 500—600 g Tannin erreicht.) Nach 24stündigem Stehen an einem kühlen Ort sintert der Niederschlag zu einer braunen Masse von pechartiger Konsistenz zusammen, die darüber stehende klare, gelbliche Flüssigkeit wird dekantiert, der Niederschlag auf ein Filter gebracht und zur Entfernung des Tannins mit bei 50° C gesättigtem Barytwasser gewaschen, bis sich an der Oberfläche der Flüssigkeit beim Umrühren ein rötlicher Schaum bildet. Zur Entfernung der letzten Reste des Tannins übersäuert man das Filtrat schwach mit Schwefelsäure und versetzt mit überschüssigem Bleioxyd, ohne das ausgeschiedene Bariumsulfat abzufiltrieren.

Nun wird der Niederschlag abfiltriert und, falls das Filtrat gegen Lackmus alkalisch ist, so engt man es zuletzt auf dem Wasserbade bis zum dünnen Sirup ein; reagiert es aber sauer, so fügt man frisch gefälltes Bleioxyd hinzu und dampft weiter ein, wobei die Reaktion alkalisch wird. Der so erhaltene Sirup erstarrt beim Stehen an einem kühlen Ort 24 Stunden lang zu einem, hauptsächlich aus Kreatin und Kreatinin bestehenden Kristallbrei, den man abfiltriert und mit eiskaltem Wasser auswäscht. Das mit der Mutterlauge vereinigte Waschwasser wird durch Versetzen mit Schwefelsäure vom ausgefallten Bleisulfat befreit und das Filtrat mit 20prozentiger Silbernitratlösung gefällt (Silberniederschlag I, bestehend aus Chlorsilber und den Resten der Purinbasen). Das Filtrat versetzt man mit 20prozentiger Silbernitratlösung, bis eine Probe in Barytwasser sofort einen braunen Niederschlag gibt (es sind 150—200 g Silbernitrat nötig). Hierauf fügt man solange kalt gesättigtes Barytwasser hinzu, bis ein Tropfen, auf einer Glasplatte mit ammoniakalischer Silberlösung versetzt, nur eine geringe oder gar keine Fällung gibt, saugt ab und wäscht mit Wasser nach.

¹⁾ H. Steyrer, Ein Beitrag zur Chemie des entarteten Muskels. Hofmeisters Beiträge **4**, 234 (1904).

²⁾ Fr. Kutscher, Über Liebig's Fleischextrakt. Zeitschr. d. Unters. d. Nahrungs- und Genußmittel **10**, 528 (1905); **11**, 582 (1906).

Um die im Silberniederschlag II enthaltenen Kreatinin- und Karnosinsilber voneinander zu trennen, verreibt man diesen mit Wasser, fügt etwas Schwefelsäure zur Beseitigung des Baryts hinzu und leitet Schwefelwasserstoff ein. Das vom Schwefelsilber getrennte Filtrat engt man zum Sirup ein, der bald zu einem Kristallbrei aus in absolutem Alkohol leicht löslichem Kreatinin und dem auch in der Hitze unlöslichen Karnosin erstarrt. Kocht man nun das Gemisch mit absolutem Alkohol mehrmals aus, so geht das Kreatinin in Lösung, während Karnosin im Rückstande bleibt. Das dem Rückstande noch anhaftende Kreatin entfernt man in der Weise, daß man den Rückstand in Wasser löst, mit Tierkohle entfärbt und zum Sirup eindampft, worauf sich Kreatin ausscheidet. Das Filtrat vom abgeschiedenen Kreatin überschichtet man mit absolutem Alkohol und läßt stehen, wobei sich das Karnosin nach einiger Zeit in Krusten ausscheidet, die man in Wasser löst und mit absolutem Alkohol ausscheidet.

Das Filtrat vom Silberniederschlag II wird mit Barytwasser bis zur vollständigen Fällung versetzt, die als Silberniederschlag III bezeichnet wird. Den abgesaugten Niederschlag suspendiert man in Wasser, zersetzt ihn mit Schwefelwasserstoff, filtriert das ausgeschiedene Schwefelsilber ab, engt das Filtrat ein, filtriert das dabei abgeschiedene Bariumkarbonat ab, versetzt das Filtrat mit Salpetersäure bis zur schwach sauren Reaktion und engt bis zur Sirupkonsistenz ein, wobei sich das in Wasser schwer lösliche Methylguanidin-nitrat in weißen, glänzenden Blättern abscheidet. Durch Umkristallisieren aus Wasser wird es gereinigt.

Das Filtrat vom Silberniederschlag III versetzt man zuerst zur Entfernung des Silbers mit Salzsäure, scheidet den Baryt mit Schwefelsäure aus, fügt zum Filtrat so viel Schwefelsäure zu, daß es 5prozentig ist, und so viel Phosphorwolframsäure, daß eine Probe auf erneute Zugabe des Fällungsmittels 1 bis 2 Minuten klar bleibt, und läßt 12 Stunden stehen. Hierauf saugt man den Niederschlag ab, versetzt ihn mit Barytwasser, das dabei ausgeschiedene Bariumphosphorwolframat filtriert man ab, wäscht mit Wasser gut nach und leitet in das Filtrat + Waschwasser bis zur vollständigen Ausscheidung des Bariumkarbonats ein. Das Filtrat vom Bariumkarbonat dampft man bis zum Sirup ein, der zu einem Kristallbrei aus Kreatin, Kreatinin und Kaliumkarbonat erstarrt. Die Mutterlauge und das Waschwasser dampft man zum Sirup ein, den man mit konzentrierter Salzsäure ansäuert und mit absolutem Alkohol versetzt, bis sich die kristallinische Fällung vermehrt. Etwaige schmierige Beimengungen bringt man durch Zufügen von Salzsäure in Lösung. Nachdem man den aus anorganischen Salzen bestehenden Niederschlag abfiltriert hat, dampft man das Filtrat ein, bis eine abgekühlte Probe auf Zusatz von gesättigter kalter alkoholischer Quecksilberchloridlösung sofort einen starken, körnig-kristallinischen Niederschlag gibt, und fällt dann die ganze Masse mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung aus. Die Fällung wird nach 24 Stunden abgesaugt, mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung ausgewaschen und als Quecksilberfällung I bezeichnet.

Man löst diesen Niederschlag in heißem Wasser, zerlegt ihn mit Schwefelwasserstoff, dampft das Filtrat vom Schwefelquecksilber bis zur Sirupkonsistenz ein und behandelt mit absolutem Alkohol, wobei etwas anorganische Substanz ungelöst bleibt, die man abfiltriert und mit Alkohol auswäscht. Das Filtrat fällt man, ohne einen größeren Überschuß anzuwenden, mit Platinchloridlösung, filtriert den Niederschlag ab, wäscht mit absolutem Alkohol aus und trennt ihn durch Verrühren in wenig kaltem Wasser in einen darin schwerlöslichen und einen leichtlöslichen Teil, von denen der erstere das wenig bekannte Platinat des Karnomuskarins und der leichtlösliche die Platinate des Neosins und Karnitins darstellen. Die Trennung der beiden löslichen Platinate führt man herbei, indem man das Platin durch Schwefelwasserstoff entfernt, das Filtrat stark eindampft und mit 10prozentiger wässriger Goldchloridlösung fraktioniert ausfällt, wobei die einzelnen Fällungen so oft bis zum dünnen Sirup eingedampft und umkristallisiert werden, bis ihr Goldgehalt konstant bleibt.

Nun wird das alkoholische Filtrat der Quecksilberfällung I eingedampft, einige Tage an einem kühlen Orte stehen gelassen, wobei eine reichliche kristallinische Fällung stattfindet, Quecksilberfällung II, die abgesaugt, mit alkoholischer Sublimatlösung gewaschen und in Wasser gelöst wird. In diese Lösung leitet man zur Entfernung des Quecksilbers Schwefelwasserstoff ein, engt das Filtrat zum Sirup ein, aus dem nach einiger Zeit salzsaures Kreatinin aus-

kristallisiert. Dieses wird mit absolutem Alkohol behandelt, abgesaugt, mit absolutem Alkohol gewaschen, das alkoholische Filtrat mit alkoholischer Platinchloridlösung gefällt und stehen gelassen. Der entstandene voluminöse Niederschlag wird abgesaugt, mit absolutem Alkohol gewaschen und in wenig Wasser suspendiert. Der dabei entstehende Rückstand wird abgesaugt, in heißem Wasser gelöst und die Lösung bis zur beginnenden Kristallisation eingedampft, wobei sich das Platinat des Oblitins ausscheidet, das man mit kaltem Alkohol und Wasser wäscht.

Das Filtrat der Quecksilberfällung II versetzt man wechselnd so lange mit gesättigter alkoholischer Natriumazetatlösung und mit gesättigter alkoholischer Quecksilberchloridlösung, bis kein Niederschlag mehr entsteht, läßt dann bis zum nächsten Tage stehen, saugt den Niederschlag ab und wäscht ihn mit einem Gemenge beider Fällungsmittel aus. Der Niederschlag wird durch Erwärmen auf dem Wasserbade von anhaftendem Alkohol befreit, unter Zusatz von etwas Salzsäure in Wasser gelöst und das Quecksilber mit Schwefelwasserstoff ausgefällt. Die vom Quecksilbersulfid abfiltrierte Lösung wird auf dem Wasserbade bis zum Sirup eingedampft, das sich ausscheidende Kochsalz durch Aufnehmen mit absolutem Alkohol entfernt, die eingeengte alkoholische Lösung mit einer heißgesättigten alkoholischen Chlorkadmiumlösung gefällt und 24 Stunden stehen gelassen. Hierauf saugt man den Kadmiumniederschlag ab, wäscht ihn mit alkoholischer Kadmiumchloridlösung, zersetzt mit Schwefelwasserstoff in der Kälte, saugt vom Kadmiumsulfid ab, dampft das Filtrat zum Sirup ein, bis sich das Histidinchlorid auszuschcheiden beginnt. Dieses wäscht man mit konzentrierter Salzsäure und absolutem Alkohol. Wird nun die Mutterlauge des Histidinchlorids weiter eingedampft und mit 30prozentiger wässriger Goldchloridlösung versetzt, so fällt das in breiten glänzenden Platten kristallisierende Goldsalz des Vitalins aus.

b) Gewinnung von Karnosin, Methylguanidin und Karnitin aus frischem Rindfleischextrakt nach Gulewitsch und Kremberg ¹⁾.

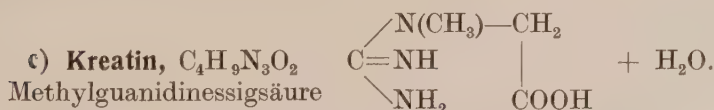
4—5 kg von Knochen, Fett und Bindegewebe befreites Rindfleisch wird in dünne Streifen geschnitten, in heißes Wasser gebracht, die Flüssigkeit eine halbe Stunde gekocht, das Fleisch fein zerhackt und mit der abgessenen Flüssigkeit noch eine Stunde gekocht. Hierauf koliert man die Flüssigkeit durch Musselin, preßt das Fleisch mit Hilfe eines Handtuches nach und kocht es mit frischem Wasser zweimal aus. Die etwa 25 Liter betragenden vereinigten Auszüge dunstet man auf etwa 1 Liter ein, versetzt mit einer 20prozentigen Lösung von essigsaurem Blei, saugt und wäscht den Bleiniederschlag ab, entfernt das Schwefelblei mittels Schwefelwasserstoff, engt das Filtrat bis auf $\frac{3}{4}$ Liter ein und fällt mit einer konzentrierten Phosphorwolframsäurelösung (unter Vermeidung eines Überschusses). Am nächsten Tage wird der Niederschlag abgesaugt, gewaschen, mit Barytwasser verrieben, filtriert, das Filtrat vom überschüssigen Baryt durch Kohlensäure befreit, mit Salpetersäure neutralisiert, auf etwa $\frac{1}{2}$ Liter eingedampft und mit 20prozentiger Silbernitratlösung versetzt, bis keine Fällung mehr entsteht — Silberniederschlag I. — Die in diesem Niederschlage enthaltenen Silberverbindungen der Purinbasen saugt und wäscht man ab, das Filtrat versetzt man so lange mit Silbernitratlösung, bis eine Probe der Flüssigkeit auf Zusatz von Barythydrat keine weiße, sondern eine gelbe, schnell schwarz werdende Fällung gibt, und versetzt hierauf mit einer warmen Barythydratlösung, wodurch ein reichlicher Niederschlag entsteht, der sorgfältig gewaschen wird — Silberniederschlag II.

Dieser Niederschlag wird durch Behandlung mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Schwefelsilber abgesaugt, das Filtrat mit Kohlensäure gesättigt und die eingeengte Flüssigkeit mit Salpetersäure neutralisiert, wobei sie zu einer festen Masse erstarrt, die aus sternartigen Drusen von nadelförmigen Kristallen von Karnosinitrat besteht. Die Kristallmasse wird abgesaugt, mit verdünntem Alkohol ausgewaschen und aus wenig Wasser umkristallisiert. Durch Einengen kann man aus dem ersten Filtrat und der Mutterlauge weitere Mengen des Salzes erhalten.

¹⁾ Wl. Gulewitsch, Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. Zeitschr. f. physiol. Chemie 45, 326 (1905). Mitteilung II, 47, 471 (1906).

Das Filtrat vom Silberniederschlag II befreit man vom überschüssigen Silber durch Einleiten von Schwefelwasserstoff, neutralisiert die filtrierte Flüssigkeit mit Schwefelsäure, fügt Magnesiumoxyd hinzu und dampft stark ein. Nach Zusatz von Barytwasser filtriert man vom schwefelsauren Baryt ab, scheidet den Überschuß desselben durch Kohlensäure ab, filtriert, neutralisiert das Filtrat mit Salpetersäure und versetzt es nach dem Eindampfen mit 20prozentiger Silbernitratlösung: gibt eine Probe der Flüssigkeit nicht einen weißen, sondern einen bald sich bräunenden gelben Niederschlag mit Barytwasser, so fällt man die Lösung mit Barytwasser vollständig aus — Silberniederschlag III. Dieser wird gut ausgewaschen, in Wasser gelöst, mit Schwefelwasserstoff behandelt, das ausgeschiedene Schwefelsilber abfiltriert, das im Filtrat noch enthaltene Baryt mit Schwefelsäure ausgefällt, die Lösung mit Salpetersäure neutralisiert, mit Tierkohle entfärbt und filtriert. Das so erhaltene Filtrat scheidet beim Eindunsten ziemlich große Drusen von kleinen und breiten Täfelchen des Methylguanidinnitrats aus.

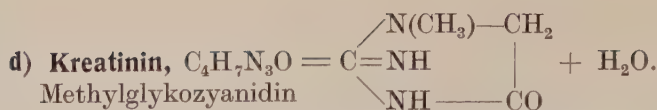
Das Karnitin gewinnt man in der Weise, daß man das Filtrat des Silberniederschlags III mit Salzsäure neutralisiert, das dadurch ausgeschiedene Chlorsilber abfiltriert, das Filtrat auf ein Volumen von 250 ccm einengt und mit dem Dragendorffschen Reagens (Kaliumwismutjodidlösung) fällt, wobei sich der orangerote Niederschlag zuerst flockig ausscheidet und auf weiteren Zusatz des Fällungsmittels sich in einen harzigen Klumpen verwandelt. Der Niederschlag wird mit Wasser abgespült und mit frisch gefälltem Bleihydroxyd gründlich verrieben, wobei sich Bleioxydjodid ausscheidet. Das Filtrat und Waschwasser wird durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Blei befreit, die jodfreie Flüssigkeit eingedampft und der Sirup mit absolutem Alkohol aufgenommen. Der Rückstand wird nun mehrmals mit Alkohol extrahiert, die vereinigten Extrakte verdunstet, der Rückstand nochmals mit absolutem Alkohol extrahiert und mit einer heißen konzentrierten alkoholischen Lösung von Quecksilberchlorid gefällt, wobei man von diesem Fällungsmittel so viel zusetzt, bis die Flüssigkeit auf Zusatz einer kaltgesättigten alkoholischen Sublimatlösung längere Zeit klar bleibt. Der nach dem Verreiben und Auswaschen mit Alkohol resultierende Niederschlag bildet das Quecksilberdoppelsalz des Karnitins, $C_7H_{14}NO_3 \cdot 2 HgCl_2$. Dieses Salz wird durch Zusatz von Tierkohle mehrmals mit heißem Wasser extrahiert, der sich aus den heißen Auszügen ausscheidende Niederschlag abfiltriert und das Filtrat stark eingedampft, worauf das gereinigte Salz in Nadeln kristallisiert.



Eigenschaften. Das Kreatin kristallisiert in durchsichtigen, farblosen, harten, stark glänzenden monoklinen Prismen, die bei 100° C das Kristallwasser verlieren. Es hat einen bitteren, kratzenden Geschmack, ist in 74 Teilen kalten Wassers löslich, viel leichter in heißem Wasser, schwer löslich in Alkohol, unlöslich in Äther. Die wässrige Lösung reagiert neutral. Kocht man das Kreatin eine Stunde lang mit verdünnter Salzsäure, so setzt es sich in Kreatinin um und kann durch die Reaktionen desselben erkannt werden.

Darstellung und Nachweis. Man extrahiert das fein zerhackte Fleisch mit der gleichen Menge Wasser von 60° C 10—15 Minuten, preßt ab und wiederholt die Extraktion noch einmal. Die vereinigten wässrigen Auszüge befreit man vom Eiweiß durch Koagulation in der Siedehitze, fällt das Filtrat mit Bleiessig, entbleit das neue Filtrat mit Schwefelwasserstoff und dampft auf ein kleines Volumen ein. Nach längerem Stehen kristallisiert das Kreatin aus, das man auf dem Filter sammelt, mit 88prozentigem Alkohol wäscht und durch Umkristallisieren aus Wasser reinigt (C. Neubauer) ¹⁾.

¹⁾ C. Neubauer, Über quantitative Kreatin- und Kreatininbestimmung im Muskelfleisch. Zeitschr. f. anal. Chemie 2, 26 (1863); 6, 33 (1867).



Eigenschaften. Kreatinin kristallisiert wasserfrei in farblosen, glänzenden Prismen des monoklinen Systems bei unvollkommener Kristallisation in Wetzsteinformen. Es löst sich in 11,5 Teilen kalten Wassers, leichter in heißem Wasser, ist schwer löslich in Alkohol, unlöslich in Äther. Es bildet sehr schwer lösliche Salze mit der Phosphormolybdänsäure, Phosphorwolframsäure und Pikrinsäure.

Nachweis. Jaffesche Reaktion. Versetzt man eine Kreatininlösung mit einer wässrigen Pikrinsäurelösung und einigen Tropfen verdünnter Kali- oder Natronlauge, so entsteht in der Kälte eine rote Färbung; beim Überschuß von Lauge wird die Lösung besonders im Lichte gelb; auch durch Ansäuern mit Essigsäure oder Salzsäure geht das Rot in Gelb über.

Reaktion von Weyl. Versetzt man eine wässrige Lösung von Kreatinin mit einigen Tropfen einer sehr verdünnten wässrigen Lösung von Nitroprussidnatrium und fügt tropfenweise verdünnte Natronlauge hinzu, so wird die Flüssigkeit vorübergehend schön rubinrot, dann gelb. Fügt man nach Salkowski Eisessig hinzu und erhitzt, so färbt sich die Flüssigkeit erst grünlich, dann blau (vom gebildeten Berlinerblau). Außer Azeton geben weder Kreatin noch ähnliche Basen diese Reaktion. Wird die Reaktion durch Azeton bedingt, so geht die ursprüngliche rote Färbung auf Zusatz von Essigsäure in Violett über und wird nicht blau.

Darstellung. Das Kreatinin wird aus kristallinischem Kreatin in der Weise dargestellt, daß man 149 Teile mit 49 Teilen Schwefelsäure in einer Schale übergießt und auf dem Wasserbade eindampft. Das dabei auskristallisierende Kreatininsulfat wird durch Zersetzen mit kohlensaurem Barium und Eindampfen in reines Kreatinin übergeführt.

Darstellung des Kreatinins aus dem Chlorzinkdoppelsalz. Das Kreatininchlorzink erhält man als Kristallpulver, indem man eine stark konzentrierte wässrige oder alkoholische, Kreatinin enthaltende Lösung mit einer neutralen, konzentrierten, alkoholischen Chlorzinklösung versetzt und 2—3 Tage stehen läßt. Um das Kreatinin daraus frei zu machen, löst man das so erhaltene Chlorzinkdoppelsalz in heißem Wasser, kocht eine halbe Stunde mit überschüssigem Bleihydroxyd oder kohlensaurem Bleioxyd, filtriert heiß, dampft das mit Tierkohle entfärbte Filtrat ein, worauf das Kreatinin in farblosen Prismen kristallisiert.

Isolierung des Kreatinins aus Fischmuskulatur. 1,5 kg frisches fein zerschnittenes Fleisch wird mit Alkohol aufgeköcht, der Auszug abgessen und der Rückstand mit neuen Mengen Alkohol wiederholt ausgeköcht. Die vereinigten Auszüge werden durch Abdampfen vom Alkohol befreit und der Rückstand durch Schütteln mit Äther entfettet, wobei sich perlmutterglänzende, bräunlich gefärbte Flitterchen von Kreatinin ausscheiden, die man durch Überführung in das Chlorzinkdoppelsalz reinigen kann.

Bestimmung des Kreatinins (bzw. des Kreatins). Man löst nach Micko¹⁾ 10—20 g festes Fleischextrakt in 100 ccm

¹⁾ K. Micko, Nahrungs- und Genußmittel 5 und 6.

Wasser, setzt 10 ccm verdünnter (1 : 3) Schwefelsäure hinzu und kocht 3 Stunden am Rückflußkühler, wodurch alles Kreatin in Kreatinin, sowie alle Xanthinstoffe umgewandelt werden, so daß sie durch Kupferbisulfit quantitativ gefällt werden. Zu diesem Zweck neutralisiert man die gekochte Flüssigkeit mit Natronlauge und versetzt in der Siedehitze mit Natriumbisulfit und Kupfersulfat — auf je 100 ccm Extrakt 300 ccm Natriumbisulfitlösung (200 g pulveriges Natriumbisulfit auf 1 Liter Wasser) und 300 ccm Kupfersulfatlösung (130 g Kupfersulfat in 1 Liter Wasser). — Die Flüssigkeit wird erhitzt, einige Minuten im Kochen erhalten, über Nacht stehen gelassen, filtriert, der Niederschlag mit ausgekochtem Wasser ausgewaschen und auf Xanthinstoffe verarbeitet.

Das Filtrat säuert man mit verdünnter Schwefelsäure an, fällt das Kupfer mit Schwefelwasserstoff, dampft die Lösung vom ausgeschiedenen Schwefelkupfer bis zur Sirupkonsistenz ein, gießt den Sirup in einen Kolben mit kochendem Alkohol, erhitzt am Rückflußkühler, neutralisiert mit alkoholischer Natronlauge (15 g Ätznatron in 100 ccm 70prozentigem Alkohol) und läßt mehrere Stunden stehen. Die klare Flüssigkeit wird abgegossen, der Rückstand mehrmals mit kochendem Alkohol ausgezogen, der Alkohol der vereinigten Auszüge abdestilliert und der Rückstand mit 95prozentigem Alkohol am Rückflußkühler wiederholt ausgekocht. Aus den vereinigten Auszügen wird der Alkohol auf 300 ccm abdestilliert, nach dem Erkalten mit alkoholischer Natronlauge bis zur schwach deutlichen alkalischen Reaktion versetzt, der ausgefallene Niederschlag abfiltriert, das Filtrat auf dem Wasserbade gelinde erwärmt und mit 0,5—1 ccm einer konzentrierten alkoholischen Chlorzinklösung versetzt. Der entstandene, geringe Mengen Kreatinin enthaltende Niederschlag wird nach dem Erkalten und Zusammenballen abfiltriert, das Filtrat auf 30—50 ccm eingeeengt und an einem kühlen Ort mehrere Tage stehen gelassen. Bei Gegenwart größerer Mengen Kreatinin scheidet sich das Chlorzinkdoppelsalz in prächtigen Drusen ab; die Kristallisation kann durch Impfen befördert werden. Ein Teil des Kreatinins bleibt selbst auf Zusatz von Natriumazetat in Lösung. Der kristallinische Bodensatz wird filtriert und mit 75prozentigem Alkohol gewaschen. Da das Kreatininchlorzink noch Kochsalz einschließt, so berechnet man die Menge desselben am besten aus dem Stickstoffgehalt. 1 Teil Stickstoff = 2,687 Teilen Kreatinin = 5,926 Teilen Kreatininchlorzink. Oder man löst das ausgeschiedene Kreatininchlorzink in heißem Wasser, zersetzt es durch Kochen mit Barythydrat, filtriert und wäscht es aus. Aus dem Filtrate entfernt man das gelöste Blei durch Schwefelwasserstoff, filtriert, dampft das Filtrat ein, wobei sich das Kreatinin neben etwas Kreatin, das sich in kleinen Mengen durch das Kochen mit Bleihydroxyd aus dem Kreatinin zurückgebildet hat, kristallinisch ausscheidet. Sie lassen sich durch Behandeln mit siedend heißem Alkohol, in dem Kreatinin löslich ist, trennen und durch die charakteristischen Reaktionen identifizieren.

8. Inosit (Hexaoxyhexahydrobenzol) $C_6H_6(OH)_6$.

Eigenschaften. Der Inosit kristallisiert in großen, farblosen, rhomboedrischen Kristallen, die an der Luft unter partieller Wasserabgabe verwittern und bei 100—110° C das Kristallwasser verlieren und bei 225° C schmelzen. Er schmeckt stark süß, löst sich in 7,5 Teilen Wasser, in starkem Alkohol und in Äther ist er unlöslich.

Nachweis. Probe von Gallois ¹⁾. Mischt man eine Inositolösung mit einer neutralen Lösung von Merkurinitrat und dampft zur Trockne ein, so erhält man einen gelblichen Rückstand, der bei weiterem Erhitzen schön rot wird. Beim Erkalten verschwindet die Färbung, um bei erneutem Erwärmen wieder zu erscheinen.

Scherers ²⁾ Probe. Dampft man etwas Inosit mit Salpetersäure auf einem Platinblech oder in einem Schälchen zur Trockne ein, befeuchtet den Rückstand mit Ammoniak und einem Tropfen Chlorkalziumlösung und dampft wieder zur Trockne ein, so erhält man einen rosaroten Rückstand.

Salkowski ³⁾ modifiziert diese Probe in der Weise, daß er einen Tropfen der Inositolösung mit je einem Tropfen Salpetersäure ($D = 1,2$) und Chlorkalziumlösung unter Zusatz von einem Tropfen 1prozentiger Platinchloridlösung zur Trockne eindampft.

Darstellung. Zur Isolierung des Inosits muß das Eiweiß aus dem Auszuge des betreffenden Gewebes durch Koagulation in der Siedehitze abgeschieden werden. Hierauf dampft man das Filtrat auf dem Wasserbade auf $\frac{1}{4}$ seines Volumens und fällt mit Bleizucker. Das Filtrat erwärmt man und versetzt mit Bleiessig, solange noch ein Niederschlag entsteht, und läßt 24 Stunden stehen. Der Bleiessigniederschlag wird ausgewaschen, in Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, vom Bleisulfid abfiltriert und stehen gelassen wobei sich nach einiger Zeit etwas Harnsäure ausscheidet. Das Filtrat wird dann bis zur Sirupkonsistenz eingedampft und kochend mit 3—4 Volumen Alkohol versetzt, von dem dabei entstandenen Niederschlag rasch abfiltriert, das erkaltete Filtrat dann mit Äther versetzt und die sich nach einiger Zeit ausscheidenden Kristalle durch Entfärbung und Umkristallisieren gereinigt. Mit den Kristallen werden die oben erwähnten Proben angestellt (Boedeker und Cooper Lane) ⁴⁾.

Die Darstellung des Inosits aus tierischen Geweben geschieht wie folgt:

Das Tier wird sofort nach dem Töten grob zerkleinert, in die dreifache Menge kochenden Wassers gebracht und etwa eine halbe Stunde gekocht. Hierauf löst man das Fleisch von den Knochen, zerkleinert diese im Mörser und läßt die Weichteile durch die Hackmaschine. Die Brühe wird nach dem Erkalten auf das ursprüngliche Volumen gebracht und mit Ätzkali bis auf 2—5 Proz. versetzt, die Organe und die Brühe bringt man in einen geräumigen Kolben, erhitzt zunächst im Wasserbade und, wenn das Schäumen aufgehört hat, im Paraffinbade bis zur Lösung. Dann gießt man die Brühe, wenn sie

¹⁾ Gallois, Zeitschr. f. analyt. Chemie **4**, 264 (1865).

²⁾ J. Scherer, Annalen der Chemie und Pharmazie **81**, 375 (1852), 346.

³⁾ E. Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chemie **69**, 479 (1901).

⁴⁾ Boedeker und Cooper Lane, Annal. de Chem. et de Pharm. **117**, 118 (1861).

auch nicht klar ist, in eine große Schale, neutralisiert mit Salpetersäure und fügt so viel konzentrierte Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,5 zu, daß ihr Gehalt 2,5 Volumprozent freier Säure entspricht, engt auf $\frac{1}{3}$ der ursprünglich verwendeten Wassermenge unter häufigem Rühren ein, neutralisiert mit heißgesättigter Barytlauge und fügt dann noch einen Überschuß hinzu, wobei die Farbe der Lösung rot bis graurot wird. Man erhitzt bei basischer Reaktion 15 Minuten lang, säuert mit Salpetersäure schwach an, dampft bis zur Sirupkonsistenz ein, versetzt dann mit 7—8 Volumprozent konzentrierter Salpetersäure in der Hitze, erhitzt noch einige Augenblicke und versetzt mit heißgesättigtem Barytwasser bis zur alkalischen Reaktion und wiederholt das Versetzen mit Säure und Lauge mehrmals. Wenn die oben schwimmende Rinde trocken und krümelig erscheint und ein pulveriger Niederschlag sich am Boden der Schale ansammelt, dampft man die Flüssigkeit bei schwach saurer Reaktion auf ein kleines Volumen ein. Nach dem Erkalten nutschts man den Niederschlag ab, wäscht ihn gründlich nach, fällt das Filtrat mit Bleizuckerlösung, läßt gut absetzen, nutschts ab und wäscht den Niederschlag durch Zerreiben mit verdünnter Bleizuckerlösung sorgfältig aus. Das so erhaltene Filtrat wird nun in der Wärme mit Bleiessig gefällt, mit Ammoniak versetzt, 12—24 Stunden stehen gelassen, der ausgeschiedene Niederschlag abgenutschts, mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Schwefelblei eingengt, wobei Inosit ausfällt. Dieses wird durch Fällung mit Baryt in methylalkoholischer Lösung gereinigt (Rosenberger)¹⁾.

9. d-Milchsäure (Paramilchsäure) $C_3H_6O_3$, $CH_3-CH \cdot OH-COOH$.

Eigenschaften. Die Milchsäure bildet einen farb- und geruchlosen Sirup, der bei $-24^\circ C$ nicht erstarrt, ist in Wasser und Alkohol löslich; in Äther löst sie sich schwer. Das spezifische Drehungsvermögen beträgt $+3,5^\circ$; über Schwefelsäure oder in einer trockenen Atmosphäre aufbewahrt, bildet die Milchsäure ein Anhydrid, das bei gewöhnlicher Temperatur stark nach links dreht. Die Salze der d-Milchsäure sind alle löslich und linksdrehend.

Dem Nachweis der Milchsäure in tierischem Material muß deren Isolierung vorangehen.

Nachweis. Die Uffelmannsche Probe²⁾. Die Lösung wird mit einigen Tropfen des blauvioletten Uffelmannschen Reagens (einige Tropfen einer 5prozentigen Eisenchloridlösung in 30 ccm einer 1prozentigen Karbolsäurelösung) versetzt, wobei die blauviolette Farbe in ein Zeisig- oder Zitronengelb übergeht.

Reaktion von Herzog und Leiser³⁾. Läßt man Jod auf das Silberlaktat einwirken, so entsteht freie Milchsäure und Aldehyd:



Man erwärmt milchsaures Silber am Rückflußkühler mit der entsprechenden Menge alkoholischer Jodlösung auf etwa $60^\circ C$ bis zur Entfärbung der Lösung, wobei der Kühler durch ein Gasleitungsrohr mit einem mit Äther und einem mit klarem Kalkwasser beschickten Absorptionsgefäß verbunden ist. Der

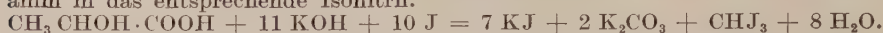
¹⁾ F. Rosenberger, Der Nachweis von Inosit in tierischen Geweben. Zeitschr. f. physiol. Chemie **56**, 373 (1908).

²⁾ J. Uffelman, Zeitschr. f. klin. Medizin **8**, 392 (1884).

³⁾ R. O. Herzog und R. Leiser, Monatshefte f. Chemie **22**, 357 (1901).

Aldehyd wird vom Äther aufgenommen, die Milchsäure befindet sich im Kolben, und die Kohlensäure ist vom Kalkwasser absorbiert. Durch den entwickelten Azetaldehyd lassen sich kleine Mengen Milchsäure nachweisen, indem man den Aldehyd durch Nitroprussidnatrium und Piperidin identifiziert.

Die Reaktion von Vournasos¹⁾ beruht auf der Umsetzung der Milchsäure mit Jod und Ätzkali zu Jodoform und Überführung des letzteren durch Methylamin in das entsprechende Isonitril.



Das erforderliche Reagens erhält man durch Lösen von 1 g Jod und 0,5 g Jodkalium in 50 cm Wasser und Versetzen der filtrierten Lösung mit 5 g Methylamin.

Man verdünnt die Lösung des Zinksalzes oder die freie Milchsäurelösung mit dem gleichen Volumen Wasser, macht mit 10 prozentiger Kalilauge alkalisch, kocht einige Minuten, fügt 1—2 cm des Reagens hinzu und kocht wieder auf, wobei der widerliche Geruch von Isonitril schon bei einem Gehalt von 0,005 Proz. Milchsäure auftritt. Bei einem geringeren Gehalt schüttelt man die Lösung mit Äther aus und prüft den Rückstand. Jodoformbildende Körper müssen vor der Anstellung der Reaktion durch Kochen entfernt werden.

W. Croner und W. Cronheim²⁾ modifizieren diese Reaktion, indem sie statt Methylamin Anilin anwenden, wobei Isozyanphenyl entsteht, das bei einem Gehalt von 0,0025 Proz. Milchsäure an seinem widerlichen Geruch leicht erkannt wird. Das Reagens stellt man dar, indem man 2 g Jodkalium und 1 g Jod in 5 cm Wasser löst, filtriert, auf 50 cm auffüllt und 5 cm Anilin hinzufügt. Die Probe wird angestellt wie nach Vournasos.

Die von Denigés³⁾ empfohlene empfindliche Probe beruht auf der Zersetzung der Milchsäure in Azetaldehyd, Kohlenoxyd und Wasser beim Erhitzen mit konzentrierter Schwefelsäure. Man erhitzt 10 cm einer 2prozentigen Milchsäurelösung mit 2 cm konzentrierter Schwefelsäure vom spezifischen Gewicht 1,84 2 Minuten in siedendem Wasserbade und fügt nach dem Erkalten 1—2 Tropfen einer 5prozentigen alkoholischen Lösung von Guajakol oder Morphin zu. Im ersten Falle entsteht eine Rotfärbung, im anderen eine Orange-färbung.

Erwärmt man nach Thomas⁴⁾ 5—10 cm der zu prüfenden Lösung mit 3—4 Tropfen einer 33prozentigen Chromsäurelösung 10 Minuten auf dem Wasserbade, so geht die ursprünglich gelbe Farbe der Lösung in Hellbraun über. Bei einem Zusatz von 5—6 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd tritt die Färbung in der Kälte nach einigen Minuten auf.

Fletscher und Hopkins⁵⁾ erwärmen im Wasserbade einige Tropfen der zu prüfenden Flüssigkeit mit 5 cm konzentrierter Schwefelsäure, 1 Tropfen konzentrierter Kupfersulfatlösung 1—2 Minuten, lassen die Flüssigkeit erkalten und fügen 2—3 Tropfen Thiophenlösung (10—20 Thiophen in 100 cm Alkohol), wobei beim Erwärmen im Wasserbade in Gegenwart von Milchsäure eine kirschrote Färbung auftritt.

Quantitative Bestimmung. Zur quantitativen Bestimmung der Milchsäure muß diese zuerst isoliert werden; dies geschieht nach dem unter Darstellung angegebenen Verfahren.

Methode von Vournasos. Man dampft 30 cm der zu untersuchenden Flüssigkeit bis auf 10 cm ein, versetzt den Rückstand in einer Retorte mit 15 cm wässriger Kalilauge und 0,5 g Jod und destilliert bei gelinder allmählicher Erhitzung $\frac{7}{10}$ des Volumens, wobei das entstandene Jodoform mit dem Destillat übergeht. Das De-

¹⁾ A. Ch. Vournasos, Zeitschr. f. angew. Chemie **15**, 172 (1902).

²⁾ W. Croner und W. Cronheim, Über eine neue Milchsäureprobe. Berliner klin. Wochenschr. **42**, 1080 (1905).

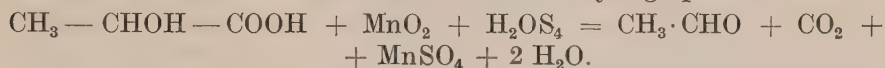
³⁾ G. Denigés, Reactions très sensibles des acides lactique et glycolique. Bullet. de la Soc. Chim. France (4) **5—6**, 647 (1909).

⁴⁾ W. Thomas, Eine neue Milchsäureprobe. Zeitschr. f. physiol. Chemie **50**, 540 (1907).

⁵⁾ F. G. Hopkins und W. M. Fletscher, Lactic acid in amphibian muscle. Journ. of Physiol. **35**, 247 (1907).

stillat verdünnt man mit 50 ccm Wasser, fügt 50 ccm einer 10prozentigen Kalilauge hinzu, säuert nach einigem Stehen mit Salpetersäure an und titriert mit $\frac{1}{10}$ Normalsilbernitratlösung. 1 ccm $\frac{1}{2}$ Normalsilberlösung entspricht 0,0029 g Milchsäure.

Methode von Boas ¹⁾. Milchsäure wird durch Oxydation mit Braunstein und Schwefelsäure in Azetaldehyd gespalten.



Dieser destilliert leicht über und gibt mit Jod Jodoform. Verwendet man Normaljodlösung und titriert mit Natriumarsenit, so kann man die Milchsäure quantitativ bestimmen. Zur Titration sind erforderlich: 1. $\frac{1}{10}$ Normaljodlösung, 2. $\frac{1}{10}$ Normalnatriumarsenitlösung, 3. Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,018, 4. Normalkalilauge, 5. Stärkelösung.

Die nach dem Verdunsten des Äthers erhaltene rohe Milchsäure wird mit heißem Wasser aufgenommen, in ein Destillationskölbchen gebracht, der mit einer mit 5—10 ccm alkalischer Vorlage verbunden ist, man fügt eine hinreichende Menge 20prozentiger Schwefelsäure und Braunstein hinzu und erhitzt. Beim ersten Aufkochen geht der entstandene Aldehyd in die Vorlage über, und es zeigt sich sofort Jodoformbildung — Geruch und gelber Niederschlag; am Ende der Destillation saugt man einen Luftstrom durch. Dem Destillat fügt man 20 ccm Jodlösung und ebensoviel Lauge hinzu, schüttelt gut durch, versetzt nach einigem Stehen der verschlossenen Vorlage mit 20 ccm Salzsäure und titriert das überschüssige Jod mit der Natriumarsenitlösung zurück. 1 ccm $\frac{1}{10}$ Normaljodlösung entspricht 0,003388 g Milchsäure.

Das gebräuchlichste Verfahren ist die Isolierung der Milchsäure mit Äther und Bestimmung als Zinksalz (s. Darstellung).

Darstellung. Die Darstellung und der Nachweis der Milchsäure in den Organen und Geweben geschieht in folgender Weise. Nach vollständiger Extraktion mit Wasser entfernt man das Eiweiß durch Koagulation in der Siedehitze unter Zusatz von einer kleinen Menge Schwefelsäure, filtriert, neutralisiert das Filtrat in der Siedehitze mit Barytwasser und dampft die filtrierte Flüssigkeit bis zum Sirup ein. Dieser wird mit absolutem Alkohol gefällt und der Niederschlag zur Lösung der Barytlaktate mit Alkohol erschöpft. Aus den vereinigten alkoholischen Auszügen wird der Alkohol abdestilliert und der Rückstand durch Ätherextraktion entfettet. Der so entfettete Rückstand wird in Wasser aufgenommen, Phosphorsäure hinzugesetzt und wiederholt mit Äther geschüttelt, in dem sich die Milchsäure löst. Nun destilliert man den Äther aus den vereinigten Auszügen ab, löst den Rückstand in Wasser und erwärmt vorsichtig auf dem Wasserbade, um den anhaftenden Äther und flüchtige Säuren zu verjagen. Diese Lösung liefert nun beim Kochen mit Zinkkarbonat eine Zinklaktatlösung, die bis zur beginnenden Kristallisation eingengt und über Schwefel-

¹⁾ J. Boas, Deutsche mediz. Wochenschr. 19, 940 (1893).

säure stehen gelassen wird. Die ausgeschiedenen Kristalle des Zinklaktats werden mit Alkohol gewaschen und lufttrocken, sowie nach dem Trocknen bei 115° C auf Wasser- und Zinkgehalt untersucht.

M. Milch.

Eigenschaften. Die Milch stellt eine Emulsion dar, die fein verteiltes Fett in einer hauptsächlich Eiweißstoffe, Milchzucker und Salze enthaltenden Flüssigkeit suspendiert enthält. Das spezifische Gewicht der Frauenmilch, der Kuh- und Eselinnenmilch, bei + 15° C, schwankt zwischen 1,028 und 1,0345. Die Reaktion der ganz frischen Milch ist regelmäßig gegen Lackmus amphoter. An der Luft verändert sich die Milch nach und nach, und ihre Reaktion wird sauer dadurch, daß der Milchzucker durch die Einwirkung von Mikroorganismen allmählich in Milchsäure übergeht. Ganz frische, amphoter reagierende Milch gerinnt beim Kochen nicht, liefert aber eine aus geronnenem Kasein und Kalksalzen bestehende Haut; selbst in Gegenwart von Kohlensäure gerinnt sie nicht. Mit der Zunahme der Säurebildung ändert sich aber dieses Verhältnis, und die Milch gerinnt im ersten Stadium nach Durchleiten eines Kohlensäurestromes, im zweiten Stadium durch Kohlensäure ohne Sieden, und im dritten Stadium gerinnt sie bei Zimmertemperatur zu einer festen Masse. Das Kaseingerinnsel zieht sich dabei, besonders in der Wärme, zusammen, und es scheidet sich eine gelbliche oder gelblichgrüne, saure Flüssigkeit (saure Molken) aus. Wird die Milch sterilisiert und der Zutritt von Mikroorganismen verhindert, so bleibt die saure Gärung vollständig aus; auch mehrere Konservierungsmittel verhindern das Sauerwerden. Versetzt man frische, amphoter reagierende Milch mit Lab, so gerinnt sie, besonders bei Körpertemperatur, unter Bildung einer festen Masse, des sog. Käse, aus dem allmählich eine gelbliche Flüssigkeit, süße Molken, ausgepreßt wird. Diese Gerinnung der Milch findet ohne Änderung der Reaktion statt. Die Frauenmilch gerinnt durch Labferment nur unvollständig in Form dünner Flöckchen oder auch gar nicht; nachdem sie aber dreimal 24 Stunden gefroren gehalten worden und dann wieder aufgetaut ist, soll sie nach der Angabe von Fuld und Wohlgemuth doch gerinnen.

Spezifisches Gewicht. Das spezifische Gewicht wird mit dem Pyknometer, mittels der Mohr-Westphalschen Wage oder mittels des Laktodensimeters bestimmt. Das Laktodensimeter ist ein Aräometer, an dessen Spindel sich nur die 2. und 3. Dezimale hinter den hinzuzudenkenden Zahlen 1,0 befinden, so daß z. B. die Zahl 25 ein spezifisches Gewicht von 1,025 bedeutet. Diese Zahlen heißen Laktodensimetergrade.

Trockensubstanz. Man mischt 10 g Milch mit etwa 30 g mit Salzsäure und dann mit Wasser gewaschenem und geglühten Seesand in einer Platin- oder Nickelschale, verdampft auf dem Wasserbade unter öfterem Umrühren und trocknet bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz.

Fett. Man mischt 20—30 ccm Milch mit ausgewaschenem und ausgeglühtem Seesand, gebranntem Gips usw., dampft auf dem Wasserbade unter Umrühren bis zur Trockne ein, zerreibt den Rückstand und extrahiert ihn im Soxhletschen Apparate etwa 5 Stunden mit Äther. Nach dem Verdunsten des Äthers wird das Fett 1 Stunde im Dampftrockenschrank getrocknet und dann gewogen.

Zum Eintrocknen der Milch eignen sich sehr gut die Adamschen fettfreien Papierstreifen oder die Dietrichsche fettfreie Watte, die gestatten, zugleich eine Trockensubstanz- und Fettbestimmung auszuführen.

Die Adamsche Methode besteht darin, daß man 10 g Milch mit einer Pipette oder aus einer gewogenen kleinen Spritzflasche auf einen horizontal ausgespannten, getrockneten und gewogenen Papierstreifen aufspritzt. Der lufttrocken gewordene Papierstreifen wird zusammengerollt, bei 100° C getrocknet, gewogen — die Differenz der beiden Wägungen ergibt die Menge der Trockensubstanz — und dann mit Äther extrahiert, der Rückstand nach dem Verdunsten des Äthers getrocknet und gewogen — das Gewicht gibt die Menge Fett an.

Die aräometrische Methode von Soxhlet besteht darin, daß man genau gemessene Mengen Milch, Kalilauge und Äther zusammenschüttelt, wobei sich das Fett vollständig in Äther löst und die ätherische Lösung sich nach kurzem Stehen an der Oberfläche sammelt. Da nun das spezifische Gewicht der abgeschiedenen Ätherfettlösung im Verhältnis zu der aufgenommenen Fettmenge steht, so kann man aus dem spezifischen Gewicht den Fettgehalt der Ätherfettlösung resp. Milch nach einer zu diesem Zwecke bestimmten Tabelle ermitteln.

Berechnung des Fett- bzw. Trockensubstanzgehaltes. Fleischmann hat zwei Formeln angegeben, nach denen man einerseits aus dem spezifischen Gewicht und dem Fett die Trockensubstanz, andererseits aus dem spezifischen Gewicht und der Trockensubstanz das Fett berechnen kann. Ist T = Trockensubstanz, F = Fett und S = spezifisches Gewicht, so ist:

$$1. T = 1,2 \times F + 2,665 \times \frac{100 S - 100}{S}$$

$$2. F = \frac{T - 2,665 \times \frac{100 S - 100}{S}}{1,2}$$

Das von Röse-Gottlieb ¹⁾ angegebene Ausschüttelungsverfahren wird von Farnsteiner in folgender Weise ausgeführt.

Man bringt in die Meßröhre 10 ccm Milch, die genau gewogen wird, versetzt mit 2 ccm 10prozentigem Ammoniak, 10 ccm absolutem Alkohol, 25 ccm Äther und 25 ccm Petroläther vom Siedepunkt 50 bis 60° und schüttelt nach jedem dieser Zusätze kräftig durch. Es empfiehlt sich, den Petroläther dann zuzusetzen, wenn sich die ätherische und wässerige Schicht vollständig getrennt haben. Nach zweistündigem Stehen liest man das Volumen der Ätherschicht ab. Hierauf pipettiert man 25 oder 50 ccm der ätherischen Lösung ab, bringt sie in ein tariertes Bechergläschen, läßt den Äther verdunsten, trocknet den Rückstand eine Stunde bei 100° und wägt nach dem Erkalten. Aus der gewogenen Menge Fett, dem abgemessenen und Gesamt-Volumen der Ätherlösung berechnet man die in der angewandten Milchmenge enthaltene Menge Fett, die man auf Gewichtsprocente umrechnet.

¹⁾ Röse-Gottlieb, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel 6, 259 (1903).

Bondzynski ¹⁾ bringt 10 ccm in das von ihm empfohlene, mit zwei kugeligen Erweiterungen versehene kalibrierte Röhrchen, fügt 10 ccm Salzsäure (spezifisches Gewicht 1,19) hinzu und kocht unter Umschwenken, bis die Flüssigkeit braun geworden ist. Hierauf kühlt man auf 40° ab, setzt 30 ccm Äther zu, schüttelt gut durch, läßt 15—20 Minuten stehen, bis sich die Flüssigkeit vollständig klar abgesetzt hat und liest das Volumen der Ätherlösung ab. Nun hebt man mit der Pipette 10 oder 20 ccm der klaren Ätherlösung ab, bringt sie in ein tariertes Gläschen, verdunstet den Äther und wägt den Rückstand nach dem Trocknen bei 100°.

1. Kasein.

Eigenschaften. Das Kasein ist ein staubfreies, weißes Pulver, das in reinem Wasser unlöslich ist, löst sich aber leicht auf Zusatz von Alkalien oder alkalischen Erden, auch Kalziumkarbonat, aus dem es die Kohlensäure austreibt. Versetzt man eine Kaseinlösung in Kalkwasser mit stark verdünnter Phosphorsäure bis zur neutralen Reaktion, so bleibt das Kasein anscheinend in Lösung, ist aber wahrscheinlich nur stark gequollen wie in der Milch, und die Flüssigkeit enthält viel Kalziumphosphat, ohne daß man eine Fällung oder Suspension sehen kann. Die kalkhaltigen Kaseinlösungen sind opalisierend und nehmen beim Erwärmen das Aussehen der mageren Milch an. Die elementare Zusammensetzung des Kaseins der Kuhmilch ist nach Hammarsten C 52,96 Proz., H 7,05 Proz., N 15,65 Proz., S 0,758 Proz., P 0,847 Proz., nach Chittenden und Painter C 53,3 Proz., H 7,07 Proz., N 15,91 Proz., S 0,82 Proz., P 0,84—0,89 Proz., aus Frauenmilch ist C 52,24 Proz., H 7,32 Proz., N 14,97 Proz., S 1,12 Proz., P 0,68 Proz., Asche 1 Proz. Die spezifische Drehung für Kuhmilch beträgt in neutraler $[\alpha]_D = -80^\circ$, in alkalischer -76° , in saurer Lösung -91° .

Kaseinlösungen gerinnen nicht beim Sieden, die Kaseinkalklösungen überziehen sich dabei, wie die Milch, mit einer Haut. Kaseinlösungen oder Milch werden durch Säuren gefällt, wobei eine salzhaltige Lösung mehr Säure verlangt als eine salzfreie, da die Fällung bei wenig Säure von den Neutralsalzen wieder gelöst wird. Das gefällte Kasein löst sich in Salzsäure und Essigsäure, wird aber aus diesen Lösungen durch einen Überschuß von Mineralsäure gefällt. Kochsalz, Magnesiumsulfat, sowie die Sulfate von Zink, Alaun und Kupfersulfat fallen das Kasein aus der neutralen Lösung oder aus der Milch mit unveränderten Eigenschaften.

Besonders charakteristisch ist die Eigenschaft des Kaseins, mit Lab in Gegenwart einer großen Menge Kalksalz zu gerinnen, während eine kalksalzfreie Lösung nicht gerinnt, wird aber derart verändert, daß sie auf Zusatz von Kalksalzen eine geronnene Masse mit den Eigenschaften des Käses gibt. Hieraus schließt Hammarsten, daß die Wirkung des Labs stets dieselbe bleibt und die Gegenwart der Kalksalze nur zur Gerinnung erforderlich sind.

Darstellung. Aus Kuh- oder Ziegenmilch stellt man das Kasein nach Hammarsten ²⁾ dar, indem man die abgerahmte Milch mit dem vierfachen Volumen Wasser verdünnt und mit so viel Essigsäure versetzt, daß die Lösung 0,75—1 Promille Essigsäure enthält, wobei sich bald das Kasein mit dem MilCHFett abscheidet, das durch ein Koliertuch abfiltriert, in einer Schale mit Wasser verrieben und durch Dekantieren möglichst zuckerfrei gewaschen wird. Das noch enthaltene Fett wird zum größten Teil abgeschöpft und der Rest durch wiederholtes Lösen mit verdünntem Alkali und Filtrieren entfernt.

¹⁾ St. Bondzynski, Chem.-Ztg. 14, Rp. 20 (1890).

²⁾ O. Hammarsten, Zur Kenntnis des Kaseins und der Wirkung des Labferments. Malys Jahresbericht 7, 152 (1877); 2, 118 (1872); 4, 135 (1874).

Das klare oder leicht opalisierende Filtrat wird zweimal durch verdünnte Essigsäure gefällt, der zuletzt entstehende Kaseinniederschlag zunächst mit reichlichen Mengen destillierten Wassers von den letzten Spuren Essigsäure befreit, dann mit Alkohol und Äther lange gewaschen und zuletzt im Soxhletapparat mit Äther bis zur vollständigen Erschöpfung extrahiert. Das so erhaltene fettfreie Kasein wird bei 60—70° C oder im Vakuum getrocknet.

Danilewski und Radenhausen ¹⁾ verfahren in der Weise, daß sie die mit dem vierfachen Volumen Wasser verdünnte Milch (2 : 8) mit 10 ccm Eisessig versetzen, wobei das Kasein sofort ausfällt. Das Kasein waschen sie auf einem Koliertuch mit 2—4 Liter schwach angesäuertem Wasser, pressen ab, verreiben mit einer geringen Menge 1—2prozentiger Ammoniaklösung, füllen den Brei auf 1000—1500 ccm auf, wobei alles in Lösung geht, während das MilCHFett sich an der Oberfläche der Flüssigkeit ausscheidet und nach 24 Stunden abgehoben wird. Hierauf versetzen sie die Lösung mit 10—12 ccm Eisessig, wodurch eine Kaseinfällung entsteht, die noch zweimal in Ammoniak gelöst und mit Essigsäure gefällt wird. Die letzte Fällung wird mit destilliertem Wasser bis zur neutralen Reaktion des Waschwassers gewaschen, abgepreßt, mit Alkohol und Äther im Soxhletapparat bis zur Erschöpfung extrahiert und getrocknet.

Aus Frauenmilch erhält man das Kasein nach Kobrak ²⁾ in der Weise, daß man die zentrifugierte Milch mit $\frac{1}{5}$ ihres Volumens $\frac{1}{10}$ Normalessigsäure versetzt und 5 Tage lang im Pergamentschlauch der Dialyse gegen täglich erneuertes Chloroformwasser unterwirft. Dann zentrifugiert man das ausgefällte Kasein ab, wäscht es mit essigsäurehaltigem Wasser, Alkohol und Äther aus, extrahiert es im Soxhletapparat mit Äther bis zur Erschöpfung und trocknet im Vakuum.

Spaltungsprodukte des Kaseins.

Isokasein und Natriumkaseid. Man läßt trockenes Kasein im Trockenschrank bei 102—107° C 12—18 Stunden stehen, schwemmt es in $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge auf, wobei Isokasein in Lösung geht, während Natriumkaseid als ziemlich feste, nicht gallertartige Masse zurückbleibt. Diese wird nun so lange mit $\frac{1}{200}$ Normalnatronlauge gewaschen, bis eine Probe sich beim Aufschwemmen mit Wasser, das mit Phenolphthalein versetzt ist, von selbst rot färbt. Das so erhaltene Natriumkaseid wird abgenutscht, mit viel Alkohol und Äther gewaschen und dann pulverisiert. Das Isokasein wird, wie das Kasein, mit Essigsäure gefällt und durch Umkristallisieren gereinigt.

Parakasein entsteht bei der Labwirkung auf gemeine Milch in Form des unlöslichen parakaseinsäuren Kalkes (Käse). Seine elementare Zusammensetzung ist: C 53,94 Proz., H 7,14 Proz., N

¹⁾ A. Danilewski und P. Radenhausen, Untersuchungen über die Eiweißstoffe der Milch. *Malys Jahresbericht* **10**, 186 (1880).

²⁾ E. Kobrak, Beiträge zur Kenntnis des Kaseins der Frauenmilch. *Pflügers Archiv* **80**, 69 (1900).

15,14 Proz., S 1,01 Proz., P 1,3 Proz. Versetzt man die kalkfreie Lösung von Kasein mit Labferment bei 37° C mit Kalziumchloridlösung, so scheidet sich bei einem Gehalt von 0,2 Proz. Kalziumchlorid ein flockiger Niederschlag aus.

Die Darstellung des Parakaseins geschieht nach Hammarsten in der Weise, daß man reines Kasein in verdünnter Natronlauge löst, die nahezu neutrale Lösung mit einer ausreichenden Menge von wirksamem Labferment (Magensaft, Magenschleimhaut usw., am besten Labpulver) versetzt und 10 Minuten im Brutschrank bei 37° C stehen läßt. Nachdem man das Lab durch Erhitzen auf 90° C zerstört und die Lösung mit dem vierfachen Volumen Wasser verdünnt hat, versetzt man vorsichtig mit sehr verdünnter Essigsäure bis zur vollständigen Fällung, filtriert den flockigen Niederschlag ab und löst ihn wieder in verdünnter Natronlauge. Nach zweimaligem Füllen mit Essigsäure aus der alkalischen Lösung wird der Niederschlag auf dem Filter mit Wasser, dann mit Alkohol und mit Äther ausgewaschen (H. Koester)¹⁾.

Quantitativ bestimmt man das Parakasein, indem man in einer gemessenen Menge der der Labwirkung unterworfenen Kaseinlösung den Stickstoffgehalt nach Kjeldahl ermittelt und mit 6,24 multipliziert, wodurch man den Gehalt an Eiweiß (Kasein) erhält. In einer gleichgroßen Probe fällt man das entstandene Parakasein mit Essigsäure, wäscht es auf dem Filter mit Wasser, bis das Waschwasser keine Biuretreaktion mehr gibt, und bestimmt darin den Stickstoffgehalt nach Kjeldahl. Der Stickstoffwert, mit 6,37 multipliziert, gibt die Menge Parakasein an.

Molkeneiweiß. Der Nachweis geschieht in der Weise, daß man reines Kasein in der eben ausreichenden Menge einer 1prozentigen Natriumkarbonatlösung löst, zentrifugiert, abgemessene Proben mit einer frischen Lablösung (1 Teil Labpulver auf 10000 Teile Wasser) versetzt, auf ein gleiches Volumen auffüllt und im Brutschrank bei 37° C stehen läßt. Nach beliebigen Verdauungszeiten erhitzt man auf 90—95° C, wodurch die Labwirkung unterbrochen wird, und fällt das entstandene Parakasein durch das gleiche Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung. Das Filtrat vom Parakasein sättigt man vollständig mit Ammoniumsulfat und fällt hierdurch das Molkeneiweiß.

Die Menge des entstandenen Molkeneiweißes erhält man, wenn man den Stickstoffgehalt der unverdünnten Filtrate des Parakaseins ermittelt. Hat man 90 ccm einer 2prozentigen Natriumkaseinatlösung der Labwirkung unterworfen, so versetzt man die Lösung nach Zerstören des Labs mit 40 g festem Kochsalz (Rohsalz mit im Mittel 0,4 Proz. Ca und 0,05 Proz. Mg), filtriert vom ausgefallenen Parakasein ab und bestimmt in 50 ccm des nicht verdünnten Filtrates = 90 ccm der ursprünglichen Lösung den Stickstoffgehalt nach Kjeldahl. Man

¹⁾ H. Koester, Einige Beiträge zur Kenntnis des Kaseins und seiner Gerinnung mit Labferment. *Malys Jahresbericht* **11**, 14 (1881).

erhält so relative Zahlenwerte über die nach wechselnden Zeiten gebildeten Molkeneiweißmengen (Petry, Schmidt-Nielsen)¹⁾.

Fuld²⁾ stellt die Molkenalbumose dar, indem er 10 g Kasein der Firma Rhenania mit einer geringen Menge Kalkwasser anrührt und auf dem Wasserbade unter Umrühren bis zur Lösung erwärmt. Hierauf neutralisiert er die Lösung mit einer sehr verdünnten Phosphorsäure sehr vorsichtig, was durch Tüpfeln auf Lackmuspapier kontrolliert wird, wobei die bleibende milchweiße Färbung der Lösung die Annäherung an den Neutralpunkt angibt. Die amphotere Lösung kühlt er mit Eisstücken auf 10 oder weniger Grad ab, teilt in zwei Portionen, versetzt eine mit einer ausreichenden Menge Lablösung und stellt beide in den Eisschrank, dessen Temperatur stets unter 10° C liegt. Er läßt die Gerinnung der künstlichen Milchlösung in der Kälte ablaufen, bringt das voluminöse Gerinnsel auf ein Filter, versetzt die abfiltrierte Molke mit Essigsäure, wodurch das Kasein und das Parakasein ausfallen. Das Filtrat von der Säurefällung befreit er von den letzten Spuren Kasein und Parakasein durch Erwärmen auf dem Wasserbade zum Sieden oder auf 70° C, unter eventuellem Zusatz einer geringen Menge Essigsäure. In dem Filtrat wird der Gehalt an Molkenalbumose durch Stickstoffbestimmung ermittelt.

2. Laktalbumin.

Eigenschaften. Es hat die Eigenschaften der Albumine und kristallisiert in ähnlicher Form wie das Serum- oder Ovalbumin. Es steht dem Serumalbumin sehr nahe, unterscheidet sich aber durch seine bedeutend niedrigere spezifische Drehung $[\alpha]_D = -37^\circ$. Die Gerinnungstemperatur liegt je nach der Konzentration und dem Salzgehalt bei + 72 bis 84° C. Seine elementare Zusammensetzung ist nach Sebelien C 52,19 Proz., H 7,18 Proz., N 15,77 Proz., S 1,73 Proz., O 23,13 Proz.

Darstellung. Man sättigt die Milch mit Magnesiumsulfat bei 30° C, wodurch Kasein und Globulin ausfallen, filtriert und fällt das Filtrat durch Zusatz von 0,5—1 Proz. Essigsäure, filtriert und preßt den ausgeschiedenen Niederschlag ab, löst ihn in wenig Wasser, neutralisiert genau und dialysiert lange gegen destilliertes Wasser. Das Dialysat dampft man in einer flachen Schale bei 30—40° C auf ein kleines Volumen ein und versetzt mit Alkohol. Der dabei ausfallende Niederschlag wird mit Alkohol-Äther ausgewaschen und getrocknet.

3. Laktoglobulin.

Eigenschaften. Das Laktoglobulin ist nach den Angaben von Sebelien³⁾ mit dem Serumglobulin identisch, das von Tiemann⁴⁾ aus Kolostrum dar-

¹⁾ E. Petry, Über die Einwirkung von Labferment auf Kasein. Hofmeisters Beiträge 8, 339 (1906). — S. Schmidt-Nielsen, Die Beziehung des Molken-eiweißes zur Labgerinnung (Parakaseinbildung). Hofmeisters Beiträge 9, 322 (1907).

²⁾ E. Fuld, Über die Molkenalbumose. Biochem. Zeitschr. 4, 488 (1907).

³⁾ J. Sebelien, Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper der Kuhmilch. Zeitschr. f. physiol. Chemie 9, 453 (1885). —

⁴⁾ H. Tiemann, Untersuchungen über die Zusammensetzung des Kolostrums mit besonderer Berücksichtigung der Eiweißstoffe desselben. Zeitschr. f. physiol. Chemie 25, 363 (1898).

gestellte Globulin hatte jedoch einen wesentlich niedrigeren Kohlenstoffgehalt, 49,83 Proz. Seine Koagulationstemperatur in 5—10prozentiger Kochsalzlösung liegt bei 72 bis 84° C.

Darstellung. Sebelien stellt das Laktoglobulin in folgender Weise dar. Man versetzt die amphoter gemachte Milch mit pulverisiertem Kochsalz unter gutem Umrühren, filtriert von der hauptsächlich aus Kasein neben Spuren von Globulin bestehenden Fällung ab, sättigt das klare Filtrat mit pulverisiertem Magnesiumsulfat, wobei eine flockige Fällung entsteht. Den zwischen Filtrierpapier abgepreßten Niederschlag löst man in wenig Wasser, sättigt die Lösung vollständig mit Magnesiumsulfat, löst den dabei ausfallenden Körper nach zweimaligem Umfällen in Wasser und unterwirft ihn der Dialyse. Die dabei entstehende Trübung wird durch eine Spur Kochsalz gelöst, die Lösung mit Alkohol gefällt und das ausgefällte Globulin mit Alkohol und Äther gewaschen.

4. Kolostrumglobulin.

Das nach der Methode von Sebelien dargestellte Kolostrumglobulin ist von dem der Milch verschieden. Seine elementare Zusammensetzung ist: C 49,83 Proz., H 7,77 Proz., N 15,28 Proz., S 1,24 Proz. Die Eiweißkörper des Kolostrums werden nach den für Milch angegebenen Methoden dargestellt.

5. Nukleon.

Zur Darstellung des Nukleons aus der Milch entfernt man nach Siegfried zuerst das Kasein und Eiweiß durch Zusatz von Essigsäure und Kochen, und dann fällt man das Kalziumphosphat mit Ammoniak. Das Filtrat wird unter Abstumpfen der sauren Reaktion mit Eisenchlorid versetzt und erhitzt, wobei sich ein Niederschlag, die Eisenverbindung des Nukleons, Carniferrin genannt, ausscheidet, der mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen wird. Aus dieser Verbindung konnte das Nukleon nicht regeneriert werden. Das Nukleon liefert bei der Spaltung mit Baryt Gärungsmilchsäure und eine Orylsäure, $C_{18}H_{28}N_4O_8$, genannte Säure, die ein gelbweißes, in Wasser lösliches und stark hygroskopisches Pulver darstellt (P. Balke)¹⁾.

6. Gesamtstickstoff.

Man bestimmt in 15—20 cem Milch den Stickstoffgehalt nach Kjeldahl. Durch Multiplikation des gefundenen Wertes mit 6,34 bei Frauenmilch und 6,37 bei Kuhmilch erhält man die Menge des Gesamteiweißes.

7. Gesamteiweißgehalt der Milch.

Fällung mit Gerbsäure nach Sebelien²⁾. 5—10 cem Milch verdünnt man mit dem neunfachen Volumen Wasser, fügt etwas

¹⁾ P. Balke, Zur Kenntnis der Spaltungsprodukte des Carniferrins. Zeitschr. f. physiol. Chemie **22**, 248 (1896/97).

²⁾ J. Sebelien, Studien über die analytische Bestimmungsweise der Eiweißkörper mit besonderer Berücksichtigung der Milch. Zeitschr. f. physiol. Chemie **13**, 157 (1889).

physiologische Kochsalzlösung hinzu und fällt mit einem Überschuß, etwa dem $1\frac{1}{2}$ fachen Volumen der angewandten Milch, Almenschers Gerbsäurelösung (eine Lösung von 4 g Gerbsäure in 8 ccm einer 25prozentigen Essigsäure und 190 ccm etwa 40—50prozentigen Alkohols). Nach dem Absitzen des entstandenen Niederschlages filtriert man durch ein getrocknetes gewogenes Filter, wäscht den Niederschlag mit Wasser nach und bestimmt den Stickstoff nach Kjeldahl. Der gefundene Stickstoffwert, mit 6,37 multipliziert, gibt die Menge Eiweiß an.

Fällung mit Alaun und Kupferoxydhydrat nach Ritt-
hausen und Munk ¹⁾. 10 ccm Milch verdünnt man in einem 250 ccm fassenden Becherglas mit Wasser auf 100 ccm, neutralisiert, falls die Reaktion deutlich alkalisch ist, erhitzt, fügt vor dem beginnenden Sieden 1—2 ccm Alaunlösung hinzu und versetzt bei beginnendem Sieden mit 2—5 ccm aufgeschwemmtem alkalifreien Kupferoxydhydratbrei von Stutzer, den man in folgender Weise darstellt: Man löst 100 g kristallisiertes Kupfersulfat in 5 Liter, fügt 2,5 g Glycerin hinzu und versetzt mit verdünnter Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion, wodurch das Kupfer als Hydrat ausfällt. Den abfiltrierten Niederschlag verreibt man mit glyzerinhaltigem Wasser (0,5 Proz.), wäscht ihn durch Dekantieren und Filtrieren alkalifrei, verdünnt mit 10 Proz. Glycerin enthaltendem Wasser bis zur Bildung einer gleichmäßigen, mit der Pipette aufsaugbaren Masse. Man kocht einige Minuten lang, filtriert nach dem Absitzen den feinflockigen Niederschlag noch warm ab, wäscht ihn mit heißem Wasser nach und bestimmt darin den Stickstoffgehalt, der mit 6,37 multipliziert, den Proteingehalt ergibt.

Bestimmung von Kasein und Albumin + Globulin in tierischer Milch außer Eselinnenmilch. 20 ccm Milch werden mit 380 ccm Wasser verdünnt und mit verdünnter Essigsäure unter Umrühren versetzt, bis ein flockiger Niederschlag entsteht, leitet Kohlensäure $\frac{1}{4}$ Stunde ein und läßt zur vollständigen Ausscheidung des Kaseins bis zum anderen Tag stehen. Es empfiehlt sich, drei Milchproben zu fällen und die bestgelungene weiter zu verarbeiten, da das Kasein sich nicht immer gut abscheidet. Man filtriert durch ein quantitatives Filter, wäscht den Niederschlag gut mit Wasser, dann mit conc. Alkohol-Äther aus und extrahiert zum Schluß im Soxhletapparat mit Äther bis zur Erschöpfung. In dem so erhaltenen fettfreien Niederschlage bestimmt man den Stickstoffgehalt, der mit 6,37 multipliziert, den Kaseinwert gibt. Im Filtrate der ersten Kaseinfällung bestimmt man das Albumin und Globulin in der Weise, daß man diese durch Erhitzen ausfällt, auf dem Filter auswäscht und den Stickstoffgehalt ermittelt, aus dem man den Albumin- + Globulingehalt durch Multiplikation mit 6,37 berechnet.

¹⁾ Ritthausen, Journ. f. prakt. Chemie **15**, 329 (1877). — J. Munk, Die quantitative Bestimmung der Eiweiß- und Extraktivstoffe in der Kuh- und Frauenmilch. Virchows Archiv **134**, 501 (1893).

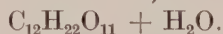
Da bei Frauenmilch das Kasein nach diesem Verfahren unvollständig ausfällt, so muß man die Essigsäure- und Kohlensäurebehandlung in der auf 40° C erwärmten verdünnten Milch ausführen.

Bestimmung von Kasein und Globulin + Albumin nach Schloßmann¹⁾. Man verdünnt 10 ccm Milch mit 30 bis 50 ccm Wasser, erwärmt auf dem Wasserbade auf 40° C und versetzt unter Umrühren mit 1 ccm konzentrierter Kalialaunlösung. Erfolgt keine mittelflockige Fällung, so fügt man ½ ccm Alaunlösung hinzu und wartet eine ½ Minute ab und verfährt so weiter, bis Koagulation und Abscheidung eintritt. Die Temperatur darf 40° C und der Alaunüberschuß 1 ccm nicht überschreiten. Hierauf filtriert man, wäscht den Niederschlag mit Wasser gut aus, bestimmt den Stickstoffgehalt und berechnet die Kaseinmenge wie oben. Im klaren Filtrat der Alaunlösung fällt man mit 10 ccm der Almenschen Gerbsäurelösung das Globulin und Albumin, deren Menge man aus dem Stickstoffgehalt ermittelt.

Bestimmung des Kaseins + Globulin und Albumins. Man verdünnt 20 ccm Milch mit 30—50 ccm einer gesättigten Magnesiumsulfatlösung, sättigt dann mit dem Salze in Substanz, filtriert und wäscht mit gesättigter Magnesiasulfatlösung aus. Im mit Äther im Soxhletapparat entfetteten Niederschlage bestimmt man den Stickstoffgehalt, und durch Multiplikation dieses Wertes mit 6,37 erhält man die Menge Kasein + Globulin. Das mit Wasser verdünnte Filtrat erhitzt man unter Zusatz von verdünnter Essigsäure bis zur Koagulation, bestimmt in dem auf einem quantitativen Filter ausgewaschenen Niederschlag den Stickstoffgehalt und ermittelt daraus die Menge Albumin durch Multiplikation mit 6,37. Die Menge Albumin ergibt sich auch aus der Differenz zwischen Gesamteiweiß und Kasein + Globulin.

Bestimmung des Stickstoffs der Extraktivstoffe. Die Menge des Stickstoffs der Extraktivstoffe erhält man durch Subtraktion des Stickstoffwertes des Gesamteiweißes von dem ermittelten Gesamtstickstoffgehalt der Milch oder indem man den Stickstoff in den Filtraten von dem ausgefällten Eiweiß bestimmt.

8. Milchzucker, Laktose



Eigenschaften. Der Milchzucker bildet farblose, rhombische Kristalle mit 1 Molekül Kristallwasser, die in 6 Teilen kalten und 2,5 Teilen kochenden Wassers löslich, in absolutem Alkohol und Äther unlöslich sind. Beim raschen Einkochen einer Milchzuckerlösung scheidet sich wasserfreier Milchzucker ab. Beim Erhitzen auf 170—180° C geht der Milchzucker in eine braune, amorphe Masse, Laktokaramel, $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$, über. Die Lösung ist rechtsdrehend; das Drehungsvermögen der auf 100° C erhitzten Lösung des Milchzuckers aus Kuhmilch wird konstant und ist $[\alpha]_{\text{D}} = +52,5^\circ$ und für Menschenmilchzucker $[\alpha]_{\text{D}} = +52,4^\circ$. Der Milchzucker vergärt nicht mit Hefe, geht aber mit gewissen Schizomyzeten in Alkoholgärung über, wobei er nach Fischer erst durch ein in der Hefe vorhandenes Enzym, eine Laktase, in Glukose und Galaktose gespalten wird.

¹⁾ A. Schloßmann, Über Eiweißstoffe der Milch und die methodische Trennung derselben. Zeitschr. f. physiol. Chemie 22, 221 (1897).

Reaktionen. Der Milchzucker gibt die Traubenzuckerreaktionen, reduziert Quecksilberoxyd in alkalischer Lösung, gibt beim Erwärmen mit essigsaurem Phenylhydrazin eine gelbe kristallinische Fällung von Phenyllaktosazon, $C_{24}H_{32}N_4O_9$, das sich durch die optische Inaktivität in einer Lösung von 2 g in 4 ccm Pyridin und 6 ccm absolutem Alkohol in 10 cm langer Schicht von den anderen Osazonen unterscheidet. Vom Traubenzucker unterscheidet er sich dadurch, daß er mit Hefe nicht gärt und mit Salpetersäure Schleimsäure gibt.

Darstellung. Zur Darstellung des Milchzuckers entfernt man aus den bei der Kaseinbereitung erhaltenen süßen Molken das Eiweiß durch Koagulation in der Hitze, filtriert, dampft das Filtrat zum Sirup ein und läßt stehen, wobei sich nach einiger Zeit Kristalle von Milchzucker ausscheiden, die mit Tierkohle entfärbt und aus Wasser umkristallisiert werden.

Quantitative Bestimmung. Man enteiweißt zuerst die Milch entweder durch Zusatz von Alkohol, der aus dem Filtrate durch Verdunstung verjagt wird, oder, indem man die Milch mit Wasser verdünnt, mit Säure das Kasein ausfällt und das Laktalbumin durch Koagulation in der Hitze entfernt. In dem so erhaltenen Filtrate bestimmt man den Zucker durch Titration mit Fehlingscher oder Knappscher Lösung oder gewichtsanalytisch (s. S. 43). 10 ccm der Fehlingschen Lösung entsprechen 0,0676 g Milchzucker, 10 ccm Knappscher Lösung entsprechen 0,0311 g Milchzucker.

Nach Scheibe ¹⁾ verdünnt man 25 ccm Milch mit 400 ccm Wasser, fügt 10 ccm einer Kupfersulfatlösung (69,28 g im Liter), 3—4 ccm Normalnatronlauge und 20 ccm einer kalt gesättigten Fluornatriumlösung zur Entfernung der Kalksalze hinzu, läßt $\frac{1}{2}$ Stunde stehen, filtriert, füllt auf 500 ccm auf und kocht 100 ccm des Filtrates mit 50 ccm Fehlingscher Lösung 6 Minuten lang auf dem Drahtnetze. Das ausgeschiedene Kupferoxydul sammelt man in einem Allihn-röhrchen oder in einem mit Asbest beschickten Goochtiegel, reduziert im Wasserstoffstrome resp. mit Methylalkohol, wägt nach dem Erkalten im Exsikkator über Schwefelsäure und rechnet den erhaltenen Kupferwert auf die entsprechende Zuckermenge nach der von Soxhlet angegebenen Tabelle um.

Die Bestimmung des Milchzuckers nach Patéin geschieht in der Weise, daß man 50 ccm Milch unter Umschütteln mit 10 ccm Merkurinitratlösung (s. Blut, S. 183) versetzt, auf 100 ccm auffüllt und vom ausgefallenen Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat versetzt man mit Natronlauge vom spezifischen Gewicht 1,3 bis zur schwach alkalischen Reaktion und verfährt weiter nach Soxhlet-Scheibe in der oben angegebenen Weise.

Polarimetrisch bestimmt Scheibe ¹⁾ den Milchzucker, indem er 75 ccm Milch mit 7,5 ccm einer 20prozentigen Schwefelsäure und 7,5 ccm einer Quecksilberlösung (40 g Jodkalium werden in 200 ccm Wasser gelöst, mit 55 g Quecksilberjodid geschüttelt, auf 500 ccm aufgefüllt und von ungelöst gebliebenem Quecksilberjodid abfiltriert)

¹⁾ A. Scheibe, Zeitschr. f. analyt. Chemie **40**, 1 (1901).

versetzt, auf 100 ccm aufgefüllt und das Filtrat im 400-mm-Rohre bei 175° C polarisiert. Bei Benutzung des Halbschattenapparates von Schmidt und Hänsch ist ein Saccharimetergrad auf 0,16428 g Milchzucker (Landolt) in 100 ccm Lösung umzurechnen. Bei Polarisationsapparaten mit Kreisteilung und Natriumlicht ist bei 20° C zu polarisieren und 1° im 400-mm-Rohr = 0,4759 g Milchzucker (Landolt) in 100 ccm zu setzen.

9. Bestimmung der Mineralstoffe.

Man versetzt 20—30 g Milch in einer geglühten gewogenen Platinschale mit einigen Tropfen Essigsäure, dampft auf dem Wasserbade unter Umrühren zur Trockne ein und verkohlt langsam über kleiner freier Flamme. Den verkohlten Rückstand zieht man durch Digerieren mit Wasser auf dem Wasserbade, brennt den Rückstand weiß, setzt die Schale mit dem wässerigen Auszug auf das Wasserbad, verdampft ihn bis zur Trockne, glüht gelinde und wägt nach dem Erkalten.

10. Bestimmung des Säuregehaltes.

Gesamtsäure. Nach Soxhlet und Henkel versetzt man 50 ccm unverdünnte Milch mit 2 ccm einer 2prozentigen alkoholischen Phenolphthaleinlösung und titriert mit $\frac{1}{4}$ Normalnatronlauge, bis eine eben bemerkbare Rotfärbung eintritt. Die verbrauchte Anzahl Kubikzentimeter Natronlauge gibt die Säuregrade an. Frische Kuhmilch zeigt 2—4 Säuregrade, Milch, die beim Kochen gerinnt, 5,5—6,5 und Milch vor der freiwilligen Gerinnung bei gewöhnlicher Temperatur 15—16°.

Thörner und Pfeiffer ¹⁾ verdünnen 10 ccm in einer bei 30 ccm Inhalt mit Marke versehenen Schüttelflasche mit 20 ccm destilliertem, säurefreiem Wasser, fügen 5 Tropfen einer 5prozentigen alkoholischen Phenolphthaleinlösung hinzu, schütteln gut durch und titrieren mit $\frac{1}{10}$ Normalalkali, bis eben Rotfärbung eintritt. Die verbrauchte Anzahl Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$ Normalalkalilauge für 100 ccm Milch zeigt die Säuregrade an. Sind für 10 ccm Milch 1,5 ccm $\frac{1}{10}$ Normalalkali verbraucht, so hat die Milch 15 Säuregrade. Frische Kuhmilch hat direkt nach dem Melken 10—18 Säuregrade, nach 6 Stunden 14—25, nach 48 Stunden 30—100. Eine Milch mit 23 Säuregraden gerinnt beim Kochen. Durch Multiplikation der verbrauchten Anzahl Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$ Normalalkali mit 0,009 erhält man die entsprechende Menge Milchsäure.

Zitronensäure. Isolierung und Bestimmung nach Scheibe ²⁾. Zur Isolierung der Zitronensäure versetzt man 400 ccm Milch mit 2,5 Normalschwefelsäure, fügt 10 g mit etwas Wasser angerührte spanische Erde zu, kocht auf, führt das Gemisch nach dem

¹⁾ W. Thörner und Pfeiffer, Chem. Zeitung **1891**, 1108; **1892**, 1496 und 1596.

²⁾ A. Scheibe, Die landwirtschaftlichen Versuchsstationen **39**, 153 (1891).

Erkalten in einen 500 ccm fassenden Meßkolben unter Nachspülen mit Wasser quantitativ über, füllt bis zur Marke auf, schüttelt gut durch und filtriert, bis das Filtrat klar abläuft, eventuell unter Erneuerung der spanischen Erde. Dann versetzt man 100 ccm des Filtrats mit so viel Barytwasser, als die vorhandene Schwefelsäure eben abgestumpft und die ursprüngliche Reaktion der Milch wieder hergestellt ist, dampft zum Sirup ein, fügt 3,2 ccm der 2,5 Normalschwefelsäure, ferner 20 ccm absoluten Alkohol und nach einigem Stehen 60 ccm Äther hinzu, wodurch der Milchzucker ausfällt, während die Zitronensäure in Lösung bleibt. Man filtriert nun in einen Destillationskolben, versetzt das Filtrat mit einem Gemisch von 100 ccm Ammoniak und 900 ccm Alkohol bis zur bleibenden Trübung, destilliert bis auf etwa 20 ccm ab und versetzt den Rückstand mit 60 ccm absolutem Alkohol und 10 ccm alkoholischem Ammoniak, wodurch die Zitronensäure als Triammoniumverbindung ausfällt. Das so ausgeschiedene zitronensaure Ammonium wird durch nochmalige Fällung mit alkoholischem Ammoniak von dem anhaftenden schwefelsauren, phosphorsauren und salzsauren Ammonium befreit.

Zur quantitativen Bestimmung der Zitronensäure, deren Prinzip darin besteht, daß man die Zitronensäure durch eine bestimmte Menge Kaliumbichromat oxydiert und den Überschuß mit Ferroammoniumsulfat zurücktitriert, sind folgende Lösungen nötig: 1. eine 4,61prozentige Kaliumbichromatlösung, deren 1 ccm 0,0102 g Zitronensäure entspricht. 2. Eine Lösung von 150 g Ferroammoniumsulfat in 100 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 900 ccm Wasser, deren Wirkungswert in der Weise festgestellt wird, daß man 20 ccm mit 80 ccm Wasser verdünnt und die Kaliumbichromatlösung aus einer Bürette so lange hinzufließen läßt, bis ein Tropfen der Mischung mit Ferrozyankalium keine Blaufärbung mehr gibt. 20 ccm der Ferroammoniumsulfatlösung verbrauchen 7,7—8 ccm der Bichromatlösung.

Man versetzt 20 ccm der konzentrierten wässrigen Ammoniumzitratlösung mit genau gemessenen 20—30 ccm Kaliumbichromatlösung und 20—25 ccm konzentrierter Schwefelsäure unter Umrühren und erhitzt etwa $\frac{1}{4}$ Stunde, bis die Kohlensäureentwicklung aufgehört hat, wobei man das Sieden vermeidet. Das Reaktionsprodukt verdünnt man mit Wasser, fügt eine genau gemessene Menge Ferroammoniumsulfatlösung im Überschuß hinzu, bis die braune Farbe sich in Grün umsetzt und titriert mit Kaliumbichromat zurück.

N. Das Ei.

1. Die Eiweißkörper des Vogeleies.

Das Weiße des Hühnereies enthält: Ovalbumin, Konalbumin, Ovoglobulin und Ovomukoid.

Der Eidotter enthält Vitelline.

Die Eihüllen sind Albumoide (Ovokeratin) und Mukoide.

Das Eiweiß ist eine schwach gelbliche, eiweißreiche, in einem Fachwerke von dünnen Häuten eingeschlossene Flüssigkeit, die an und für sich dünnflüssig ist und nur durch die Anwesenheit der dieselbe durchsetzenden feinen Membranen zähflüssig erscheint. Das Eiweiß hat ein spezifisches Gewicht von 1,045 und eine saure Reaktion gegen Lackmus. Es enthält 850—880 Promille Wasser, 100—130 Promille Eiweißkörper und 7 Promille Salze. Außerdem kommen im Eiweiß Spuren von Fett, Seifen, Lezithin und Cholesterin vor. Unter den Extraktivstoffen fand Lehmann eine gärende Zuckerart.

2. Proteine des Eiweißes.

Ovalbumin. Nach Osborne und Campbell unterscheidet man zwei verschiedene Ovalbumine oder Hauptfraktionen, von denen sie die kristallisierende als „Ovalbumin“ und die nicht kristallisierende als „Konalbumin“ bezeichnen. Beide Fraktionen haben eine nur wenig abweichende elementare Zusammensetzung; das Konalbumin gerinnt zwischen 50—60° C, näher an 60°, das Ovalbumin bei 44° C oder höherer Temperatur.

Darstellung. Nach dem „Säureverfahren“ von Hopkins und Pinkus ¹⁾ wird das vom Eigelb abgetrennte Eierklar mit etwa 2 Volumina Wasser verdünnt und mit dem gleichen Volumen Ammoniumsulfat versetzt, wobei ein Globulinniederschlag ausfällt, den man nach einiger Zeit abfiltriert. Das Filtrat versetzt man mit konzentrierter Ammoniumsulfatlösung, bis ein deutlicher bleibender Niederschlag auftritt, dann fügt man vorsichtig destilliertes Wasser hinzu, bis der Niederschlag eben verschwindet und versetzt schließlich mit 10prozentiger Essigsäure tropfenweise bis zur vollständigen Ausscheidung. Es scheiden sich Kristalldrusen, gemengt mit isolierten Kristallnadeln, aus, die aus wässriger Lösung durch Zusatz konzentrierter Ammoniumsulfatlösung bis zur beginnenden Fällung umkristallisiert werden.

Zur Darstellung des Konalbumins befreit man nach Langstein Eierklar durch Schlagen von seinen Membranen und versetzt das Filtrat mit dem gleichen Volumen einer mit Lakmoid neutral reagierenden gesättigten Ammoniumsulfatlösung. Das ausgeschiedene Ovoglobulin filtriert man ab und läßt aus dem Filtrat das Ovalbumin auskristallisieren. Fallen aus der Mutterlauge auch nach wochenlangem Stehen keine Albuminkristalle mehr aus, filtriert man und dialysiert gegen fließendes Wasser bis zum Verschwinden der Schwefelsäurereaktion und erhitzt dann auf dem Wasserbade bei 50—60° C, wobei sich die Albuminreste ausscheiden. Man filtriert von diesen ab, erhitzt das Filtrat auf 90° C und erhält das Koagulat des Konalbumins, das man abfiltriert und dann tagelang bis zum Verschwinden der Schwefelsäurereaktion und des Niederschlages auf Zusatz von Phosphorwolframsäure mit heißem Wasser wäscht. Es wird bei 110° getrocknet.

¹⁾ F. G. Hopkins und S. N. Pinkus, Bemerkungen über die Kristallisation tierischer Albuminstoffe. Journ. of Physiol. **23**, 130 (1898).

Ovoglobulin. Es wird durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfatlösung und durch Sättigung mit Magnesiasulfat gefällt und koaguliert bei etwa 75° C. Durch wiederholtes Auflösen in Wasser und Ausfällung mit Ammoniumsulfat wird ein Teil des Globulins unlöslich.

Die Darstellung des Ovoglobulins geschieht nach Langstein in der Weise, daß man eine durch Schlagen von Membranen befreite, filtrierte Eierklarlösung mit dem gleichen Volumen gesättigter neutraler Ammoniumsulfatlösung versetzt, den entstandenen Niederschlag abfiltriert, in einer verdünnten Salzlösung löst und ihn mehrmals mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung ausfällt. Da aber ein Teil des Globulins in verdünnten Salzlösungen bald unlöslich wird, so bedient man sich der Zentrifuge. Der so erhaltene gereinigte lösliche Anteil des Gesamtglobulins wird mit Alkohol auskoaguliert, bis zum Verschwinden der Schwefelsäurereaktion gewaschen und bei 110° C getrocknet. Zur Gewinnung des Gesamtglobulins reinigt man die erste Ammonsulfatfällung durch Waschen mit einer 40prozentigen Ammonsulfatlösung, bis die ablaufende Flüssigkeit biuretfrei ist. Durch drei- bis viermaliges Verreiben mit 40prozentiger Ammoniumsulfatlösung entfernt man das Ovalbumin und Ovomukoid.

Ovomukoid. Es ist ein Eiweißkörper mit den Eigenschaften der Muzine und wird für ein Glukoproteid, für einen derjenigen schleimartigen Eiweißkörper, an deren molekularem Aufbau eine Kohlehydratgruppe (das Glukosamin) beteiligt ist, gehalten. Eine Lösung von Ovomukoid wird, mit Ausnahme von Phosphorwolframsäure und Gerbsäure, weder von Mineralsäuren noch von organischen Säuren gefällt. Von Metallsalzen gibt nur Bleiessig bei Zusatz von Ammoniak einen Niederschlag.

Nachweis. Man entfernt in der zu prüfenden Lösung die Proteine durch Auskoagulieren in der Siedehitze, fällt das nicht reduzierende Filtrat mit Alkohol und untersucht den Niederschlag auf seinen Kohlehydratgehalt, indem man ihn mit 3prozentiger Salzsäure 3 Stunden kocht und die neutralisierte Lösung mit Fehlingscher Lösung prüft.

Darstellung. Man erhitzt eine frische Lösung von Eiereiweiß unter Zusatz von Essigsäure zum Sieden, dampft das Filtrat ein und fällt mit Alkohol. Durch wiederholtes Lösen und Füllen mit Alkohol wird das Ovomukoid gereinigt (Mörner)¹⁾.

Willanen²⁾ verdünnt Hühnereiweiß mit dem vierfachen Volumen Wasser, schüttelt gut durch, kocht ab, gießt die klare Lösung in das 1½fache Volumen heißen Wassers, versetzt mit Essigsäure bis zur eben sauren Reaktion und erhitzt unter Umrühren bis zum starken Sieden. Hierauf wird das Filtrat auf dem Wasserbade auf ein kleines

¹⁾ C. Th. Mörner, Über eine im Hühnereiweiß in reichlicher Menge vorkommende Substanz. *Zeitschr. f. physiol. Chemie* 18, 525 (1894).

²⁾ K. Willanen, Über das Verhalten des Ovomukoids im Organismus. *Biochem. Zeitschr.* 1, 109 (1906).

Volumen eingedampft, filtriert und in die fünffache Menge absoluten Alkohols gegossen. Der entstandene Niederschlag wird wiederholt in Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt und zuletzt mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen, wobei ein trockenes Ovomukoidpulver entsteht.

Die Darstellung nach Milesi geschieht in der Weise, daß man das Gesamteiweiß des Eierklares durch einen großen Überschuß von 99prozentigem Alkohol koaguliert, das Koagulum abfiltriert, im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur trocknet, das so erhaltene Pulver wird mit wenig kaltem Wasser ausgezogen und mit dem fünffachen Volumen absoluten Alkohols gefällt.

3. Proteine des Eidotters.

Vitellin siehe Dr. W. Glikin, Chemie der Fette, Lipide und Wachsarten. Bd. 1, S. 428.

Nachweis und Bestimmung der Stoffwechselprodukte im Harn.

Bestimmung des Trockenrückstandes.

Der Harn stellt eine Lösung von organischen und anorganischen Substanzen in Wasser dar; die Summe beider nennt man Trockenrückstand oder auch feste Bestandteile. Will man also den Trockenrückstand bestimmen, so läßt man eine genau gewogene resp. gemessene Menge Harn auf dem Wasserbade bis zur Trockne verdunsten und wägt den Rückstand. Beim Verdunsten auf dem Wasserbade erhält man aber stets einen sirupartigen Rückstand, der nie vollständig trocknet und dauernd Spuren von Ammoniak infolge der Einwirkung des sauren Natriumphosphats auf den Harnstoff in konzentrierter Lösung entwickelt. Der Harnstoff wird beim starken Eindampfen der wässrigen Lösung durch dieses Salz in Kohlensäure und Ammoniak zerlegt; letzteres verbindet sich mit dem Natriumphosphat zu $\text{Na}(\text{NH}_4)\text{PO}_4$, wird aber wieder bei 100°C abgespalten. Etwas bessere Resultate erhält man, wenn man den Harn vor dem Eindampfen mit Essigsäure ansäuert und die saure Reaktion beim Eindampfen durch wiederholten Essigsäurezusatz erhält.

Um diesem Fehler aus dem Wege zu gehen, empfiehlt Neubauer, die Menge des entweichenden Ammoniaks zu bestimmen und dieses als Harnstoff berechnet der Trockensubstanz hinzuzuaddieren. Die Gesamtmenge der Trockensubstanz erhält man durch Eindampfen des Harnes in einem trocknen Luftstrome, am besten in einem Strome von reinem und trockenem Wasserstoffgas bei 100°C . Zu diesem Zwecke bedient man sich eines zylindrischen, aus Blech gefertigten tiefen Wasserbades, durch dessen Mitte ein senkrecht zur Achse des Zylinders, an den Außenseiten etwas vorstehendes Blechrohr geht, das zur Aufnahme eines Glasrohres dient. Dieses Glasrohr ist an einem Ende mit

einem großen Chlorkalziumrohr verbunden und reicht mit dem anderen, ausgezogenen und rechtwinklig umgebogenen Ende fast bis auf den Boden eines mit titrierter Schwefelsäure beschickten Glaskölbchens. Durch die zweite Durchbohrung des Pfropfens geht ein Glasröhrchen, das zur Verbindung des Kolbens mit einem Aspirator oder Wasserluftpumpe dient, um fortwährend einen Luftstrom durch den Apparat saugen zu können. Ein Porzellan- oder Platinschiffchen wird zu $\frac{2}{3}$ mit reinen Glassplittern oder ausgeglühtem reinen Quarzsand angefüllt, bei 100° C getrocknet und in einem Rohr, das mit einem mit Stanniol überzogenen Korken verschlossen ist, gewogen. Hierauf läßt man genau 2 ccm Harn (der Harn kann auch gewogen werden, oder das Gewicht ergibt sich aus dem Volumen durch Multiplikation mit dem spezifischen Gewicht) auf die Splitter fließen und schiebt das Schiffchen in das Glasrohr, das in das Blechrohr des Wasserbades paßt. Nachdem man die Verbindungen hergestellt hat, heizt man das Wasserbad und saugt einen mäßigen Luftstrom durch den Apparat etwa 3 Stunden. Nun spült man das sublimierte kohlen saure Ammon aus dem Glasrohr, in dem sich das Schiffchen befand, läßt das Spülwasser in das Kölbchen mit der Schwefelsäure einfließen, entfernt die Kohlensäure durch Aufkochen der Flüssigkeit und titriert die überschüssige Schwefelsäure mit titrierter Natronlauge zurück. Die so erhaltene Menge Ammoniak wird auf Harnstoff umgerechnet; diese Menge Harnstoff wird zu dem im Schiffchen gewogenen Rückstande hinzuaddiert, und man erhält auf solche Weise das wirkliche Gewicht der Trockensubstanz in 2 ccm Harn.

Bestimmung der Gesamtasche.

Die Bestimmung der Gesamtasche geschieht nach den S. 110 bei der Bestimmung der Alkalien und alkalischen Erden angegebenen Vorschriften unter Benutzung von 10 ccm Harn.

Bestimmung der organischen Substanz.

Den Inhalt an organischer Substanz ermittelt man durch Subtraktion der Gesamtasche von dem Gesamtrockenrückstande.

2. Gesamtstickstoff.

a) Den Gesamtstickstoff bestimmt man nach dem Kjeldahlschen Verfahren (S. 14), indem man, je nach der Konzentration des Harnes, 5 oder 10 ccm in einem Kjeldahlkolben mit 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure vom spezifischen Gewicht 1,84 übergießt, einen Tropfen metallischen Quecksilbers oder einige Tropfen Kupfersulfatlösung hinzufügt und auf dem Drahtnetz zuerst mit kleiner und dann mit voller Flamme so lange erhitzt, bis die Flüssigkeit wasserklar bzw. hellgrün geworden ist, wobei der Stickstoff in Ammoniak übergeführt wird; dieser wird von der Säure gebunden.

b) Die Methode der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl eignet sich nicht für nitrathaltige Harne, da die durch die Schwefelsäure frei-

gemachten Stickstoffoxyde einen Teil des Harnstoffs unter Entwicklung von Stickstoff zersetzen. In solchen Harnen gelingt es nach Bardach ¹⁾, den Stickstoff quantitativ zu bestimmen, wenn man zuerst in schwach alkalischer Lösung die Salpetersäure mittels Aluminiumspänen reduziert, wodurch Ammoniak gebildet wird.

Man bringt in einen 500 ccm fassenden Kjeldahlkolben 10 ccm salpetersäurehaltigen Harnes, 3 g geglähter Aluminiumspäne, verdünnt unter Nachspülen des etwa im Halse haftengebliebenen Aluminiums mit 20 ccm Wasser, fügt 5 ccm Natronlauge vom spezifischen Gewicht 1,34 zu und verbindet den Kolben rasch mit einem titrierte Schwefelsäure enthaltenden Absorptionsgefäß. Die Verbindung wird mittels eines doppelt durchbohrten Stopfens, in dessen einer Öffnung sich ein Destillationsaufsatz mit ca. 40 cm langem, einfachem Kühler befindet, hergestellt, während in die andere Öffnung eine bis an den Boden des Kolbens reichende, unten etwas verengte Glasröhre eingelassen ist, die in ihrem äußeren, rechtwinklig gebogenen Ende ein Stück Schlauch mit Quetschhahn trägt. Den Kolben samt Inhalt läßt man unter öfterem Umschütteln $\frac{3}{4}$ Stunde stehen, erhitzt dann mit ganz kleinem Flämmchen etwa 5 Minuten, bis die Wasserstoffentwicklung nachgelassen hat, saugt einen langsamen Luftstrom durch, öffnet die Schraube und läßt erkalten. Hierauf spült man das in den Kjeldahlkolben eintauchende Rohr sowie das Kühlrohr in dem Kjeldahlkolben ab, fügt vorsichtig unter Umschütteln (Berücksichtigung der alkalischen Reaktion) 30 ccm konzentrierter Schwefelsäure zu, erhitzt und versetzt gegen Ende der Oxydation mit etwas Kaliumpermanganat bis zur Farblosigkeit und destilliert die so erhaltene Masse nach Kjeldahl. (Wird statt des 500 ccm-Kolbens gleich von Anfang an ein entsprechend größerer benutzt, so kann die ganze Manipulation in demselben Kolben ausgeführt werden.) Als Vorlage wird entweder das erstgebrauchte oder ein neues Gefäß benutzt. Zu beachten ist dabei, daß wegen der ziemlich lebhaften Wasserstoffentwicklung einerseits durch den Wasserstoff Natronlauge mit in die Vorlage gerissen werden kann, andererseits durch die Geschwindigkeit, mit der der das Ammoniak mit sich führende Wasserstoff die Vorlage passiert, leicht geringe Mengen Ammoniak die Vorlage unabsorbiert verlassen können. (Wird bei der Reduktion gleich von Anfang an erhitzt und wird nur ein Erlenmeyerkolben als Vorlage benutzt, so wird die Reaktion wohl in sehr kurzer Zeit beendet, aber es werden auch beide Fehler nachweisbar sein.) Diesen Fehlern begegnet man am besten, indem man zur Vermeidung eines Überspritzens einen entsprechenden einfachen Destillationsaufsatz verwendet und die Reduktion sich allmählich vollziehen läßt, ohne zu kochen.

3. Harnstoff $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$.

Nachweis. Erhitzt man Harnstoff in Substanz in einem Reagenzrohre, so schmilzt er, zersetzt sich und gibt Ammoniak ab, wobei ein undurchsichtiger,

¹⁾ Bardach, Zeitschr. f. analyt. Chemie **36**, 776 (1898).

weißer, Zyansäure und Biuret enthaltender Rückstand zurückbleibt, der in Wasser gelöst, mit Kupfersulfat und Kalilauge versetzt, eine schön rotviolette Flüssigkeit liefert (Biuretreaktion).

Versetzt man Harnstoff in Substanz mit konzentrierter Furfurollösung und Salzsäure, so tritt eine von Gelb durch Grün in Blau und Violett übergehende Färbung auf, die nach wenigen Minuten prachtvoll purpurviolett wird (Schiff)¹⁾.

Huppert empfiehlt 2 ccm einer konzentrierten Furfurollösung mit 4 bis 6 Tropfen konzentrierter Salzsäure zu versetzen, wobei keine Rotfärbung auftreten darf, und einen kleinen Harnstoffkristall einzutragen; in wenigen Minuten tritt eine violette Färbung auf.

Der Harnstoff bildet mit vielen Säuren kristallinische Salze, von denen das salpetersaure und oxalsaure Salz besonders charakteristisch sind. Salpetersaurer Harnstoff bildet rhombische oder sechseckige Täfelchen, oxalsaurer Harnstoff prismatische Kristalle.

Quantitative Bestimmung. Von den zur quantitativen Bestimmung des Harnstoffs vorgeschlagenen Methoden ist die von Mörner-Sjöquist²⁾, modifiziert von Salaskin und Zaleski³⁾ und Braunstein⁴⁾, sowie die von Folin⁵⁾ am zuverlässigsten und am leichtesten ausführbar.

Methode von Mörner-Sjöquist.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß man zuerst nach Zusatz einer Lösung von Bariumchlorid und Bariumhydrat oder bei Gegenwart von Zucker, nach Zusatz von festem Bariumhydroxyd, die übrigen stickstoffhaltigen Harnbestandteile, mit Ausnahme von Harnstoff, Ammoniak, Hippursäure, Kreatinin und Spuren von Allantoin, mit Alkoholäther ausscheidet. In dem eingeeengten Filtrate wird, nach dem Verjagen des Ammoniaks, der Stickstoff des Harnstoffs nach Kjeldahl bestimmt. Enthält der zu untersuchende Harn nur Spuren von Hippursäure, so wird die Bestimmung in folgender Weise ausgeführt:

Man versetzt 5 ccm Harn in einer mit eingeschliffenem Stöpsel verschließbaren Flasche mit 5 ccm einer 5 Proz. Bariumhydrat enthaltenden gesättigten Bariumchloridlösung und 100 ccm einer Alkohol-Äthermischung, die aus 2 Teilen 90 prozentigen Alkohol und 1 Teil Äther besteht. Der hierbei entstehende Niederschlag wird am folgenden Tage abfiltriert, 6—7 mal mit der Alkohol-Äthermischung ausgewaschen und das Filtrat auf dem Wasserbade bei einer Temperatur von 50—55 °C bis auf 20—25 ccm eingedampft. Hierauf fügt man etwas Wasser und etwa 0,3 g Magnesiumoxyd hinzu und erwärmt die Flüssigkeit weiter, bis die entweichenden Dämpfe keine alkalische Reaktion mehr zeigen. In dem so erhaltenen Rückstande, der 10—15 ccm beträgt, wird der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

¹⁾ Schiff, Eine Harnstoffreaktion. Chem. Ber. 10, 773 (1877).

²⁾ K. A. H. Mörner und J. Sjöquist, Eine Harnstoffbestimmungsmethode. Skand. Arch. f. Physiol. 2, 438 (1891). Zur Bestimmung des Harnstoffs im Menschenharn. Ibidem 14, 297 (1903).

³⁾ Salaskin und Zaleski, Über die Harnstoffbestimmung im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie 28, 73 (1899).

⁴⁾ A. Braunstein, Über die Harnstoffbestandteile im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 381 (1901).

⁵⁾ Folin, Eine neue Methode zur Bestimmung des Harnstoffs im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 501 (1901); 36, 333 (1902).

Bei Gegenwart von Hippursäure und Kreatinin verfährt man nach Braunstein in der Weise, daß man den Rückstand mit 10 g kristallisierter Phosphorsäure in einem kleinen Erlenmeyerkolben in einem Luftbade, nachdem alles Wasser verdunstet ist, $4\frac{1}{2}$ Stunden auf $140\text{--}145^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Bei dieser Temperatur wird die Hippursäure nicht zersetzt, und der durch die Fällung bedingte Fehler fällt weg. Nach dem Erkalten bringt man den Rückstand mit Wasser quantitativ in einen Kjeldahlkolben, versetzt die Lösung mit Lauge und destilliert das Ammoniak in eine mit titrierter Schwefelsäure beschickte Vorlage über.

1 ccm $\frac{1}{10}$ Normalschwefelsäure entspricht $0,001401\text{ g N} = 0,003\text{ g Harnstoff}$.

Methode von Folin.

Diese Methode besteht darin, daß man durch Erhitzen von Harnstoff mit Salzsäure und kristallisiertem Magnesiumchlorid, das bei $112\text{--}115^{\circ}\text{C}$ in seinem Kristallwasser schmilzt und dann bei etwa $150\text{--}155^{\circ}$ siedet, den Harnstoff vollständig zersetzen kann, während Hippursäure und Kreatinin unverändert bleiben. Das aus dem Harnstoff entstandene Ammoniak wird abdestilliert und titriert. Das präformierte Ammoniak des Harnes muß gesondert bestimmt werden.

Man dampft den zu untersuchenden Harn mit Salzsäure zur Trockne ein, oder man verfährt direkt, indem man 3 ccm Harn mit 20 g Magnesiumchlorid und 2 ccm konzentrierter Salzsäure in einem Erlenmeyerkolben am Rückflußkühler unter Zusatz eines kleinen Stückchens Paraffin zur Vermeidung des Schäumens 10 Minuten kocht und dann im gelinden Kochen $45\text{--}60$ Minuten erhält. Hierauf verdünnt man die heiße Flüssigkeit mit Wasser, bringt sie in einen Literkolben, verdünnt den Inhalt mit Wasser auf etwa 500 ccm, fügt etwas Talkum und 7 bis 8 ccm 20 prozentiger Lauge hinzu, destilliert das Ammoniak in eine mit titrierter Lösung beschickte Vorlage über und titriert.

Die zuverlässigsten Resultate erhält man am besten, wenn man die Methode von Mörner-Sjöquist mit der Folinischen kombiniert.

Die Methode besteht darin, daß man 5 ccm Harn mit 1,5 g gepulvertem Bariumhydroxyd versetzt; nachdem dieses unter Umschwenken gelöst worden ist, versetzt man mit 100 ccm eines Gemisches aus 2 Teilen Alkohol und 1 Teile Äther, wobei am folgenden Tage ein Niederschlag ausfällt, der mit Alkoholäther ausgewaschen wird. Hierauf wird der Äther-Alkohol bei $55\text{--}60^{\circ}\text{C}$ höchstens abdestilliert, die im Kolben zurückgebliebene Flüssigkeit wird mit 2 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,24 pro 5 ccm Harn versetzt und bis zur Trockne auf dem Wasserbade eingedampft. Dieser Rückstand wird nun nach Zusatz von 20 g kristallinischem Magnesiumchlorid und 2 ccm konzentrierter Salzsäure unter Rückflußkühler auf dem Drahtnetze mit kleiner Flamme zwei Stunden im Kochen erhalten. Man verdünnt dann mit Wasser bis zu $\frac{3}{4}$ — 1 l, fügt Natronlauge hinzu und destilliert das beim Erhitzen frei werdende Ammoniak in eine mit einer bestimmten Menge titrierter Schwefelsäure über. Das so erhaltene Destillat wird einige Minuten gekocht, um die Kohlensäure zu vertreiben, abgekühlt und der Überschuß an Säure mit $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge zurücktitriert. Für das im Harn präformierte und das im Magnesiumchloride enthaltene Ammoniak müssen entsprechende Korrekturen angebracht werden. Mörner fand in verschiedenen

Proben von Magnesiumchlorid eine 0,24 bis 0,8 ccm $\frac{1}{10}$ n entsprechende Menge in 20 g des Salzes.

Bei Anwesenheit von Zucker hält Mörner die Vorbehandlung des Harnes mit Bariumhydroxyd für absolut notwendig, da sonst die aus dem Zucker entstandenen Huminsubstanzen Stickstoff aufnehmen und zurückhalten.

4. Kreatinin $C_4H_7N_3O$.

Nachweis. Versetzt man den zu prüfenden Harn mit einigen Tropfen einer frisch bereiteten, stark verdünnten Nitroprussidnatriumlösung und einigen Tropfen Natronlauge, so färbt sich die Flüssigkeit rubinrot, wird aber wieder gelb (Weyl)¹⁾. Wird die abgekühlte, gelb gewordene Lösung mit Essigsäure neutralisiert, so scheidet sich eine Nitrosoverbindung ($C_4H_6N_4O_2$) des Kreatinins in Kristallen ab (Kramm)²⁾. Setzt man aber einen Überschuß von Essigsäure hinzu (etwa $\frac{1}{4}$ des Volumens) und erhitzt, so färbt sich die Lösung zuerst grün und dann blau und scheidet beim Stehen einen Niederschlag von Berlinerblau ab (Salkowski)³⁾.

Wird Harn mit einer wässrigen Pikrinsäurelösung und einigen Tropfen Natronlauge versetzt, so färbt sich die Lösung schon bei Zimmertemperatur intensiv rot; diese Färbung geht auf Säurezusatz in Gelb über (Jaffé).

Darstellung. Zur Isolierung des Kreatinins aus dem Harn sind mehrere Methoden angegeben. Die Methode von Folin, die auf der Fällung des Kreatinins als Kreatininpikrat basiert; die Methode von Jaffé, nach der das Kreatinin als Kreatininchlorzink gefällt wird.

Darstellungsmethode nach Folin⁴⁾.

Man bereitet eine alkoholische Lösung von Pikrinsäure, 40 g Pikrinsäure in 100 ccm kochendem Alkohol, versetzt unter Umrühren den Harn mit dieser heißen Lösung (18 g Pikrinsäure für je 1 Liter Harn) und setzt das Umrühren fort, bis die Ausscheidung des Pikrates beginnt. Nach $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ Stunde ist fast alles Kreatinin in dem schweren, sandigen Bodensatz enthalten. Die durch die ausgeschiedene Harnsäure getrübe Flüssigkeit wird vollständig abgehebert, der Bodensatz abgenutscht und mit gesättigter Pikrinsäurelösung sorgfältig ausgewaschen. Der feuchte Niederschlag wird gewogen und mit etwa halb so viel Gewichtsteilen Kaliumbikarbonat und zirka 150 ccm Wasser pro je 4 Liter Harn eine halbe Stunde in einer großen Reibschale verrieben. Durch diese Behandlung geht das Kreatinin quantitativ in Lösung, und die frei werdende Pikrinsäure wird in das schwerlösliche Kaliumsalz übergeführt, das man nun auf dem Saugfilter mit kleinen Mengen Kaliumkarbonatlösung auswäscht. Das sämtliche Kreatinin und Kaliumbikarbonat neben geringen Mengen Verunreinigungen enthaltende Filtrat wird vorsichtig mit 20 prozentiger Schwefelsäure neutralisiert, die schwach saure Lösung mit 2 Volumina Methyl- oder Äthylalkohol vermischt und ohne zu filtrieren mit Tierkohle entfärbt. Nach einigen Minuten filtriert man, um die Tierkohle und das gesamte,

¹⁾ Weyl, Chem. Berichte **11**, 2175 (1878).

²⁾ Kramm, Zentralbl. f. mediz. Wissensch. 1897.

³⁾ Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chemie **4**, 133 (1880); **9**, 127 (1885).

⁴⁾ O. Folin, Beitrag zur Chemie des Kreatinins und Kreatins. Zeitschr. f. physiol. Chemie **41**, 223 und 235 (1904).

durch Alkohol ausgefällte Kaliumsulfat zu entfernen, läßt das schwachgelbe Filtrat bis zum nächsten Tage stehen und filtriert nochmals. Dieses Filtrat enthält neben geringen Spuren von Kaliumsulfat das gesamte Kreatinin, abzüglich etwa 0,5—1 g, die von der Tierkohle zurückgehalten werden.

Die Kreatininlösung wird mit konzentrierter Zinkchloridlösung allmählich versetzt, so lange ein Niederschlag entsteht, bis zum nächsten Tage stehen gelassen, das entstandene Doppelsalz, Kreatininchlorzink, abfiltriert und mit 50 prozentigem Alkohol mehrmals ausgewaschen. Das Kreatininchlorzink wird durch Behandlung mit Bleihydroxyd vom Zink und Chlor befreit. Nach dem Kochen mit dem Bleihydroxyd, das im Überschuß vorhanden sein muß, leitet man Schwefelwasserstoff einige Minuten durch, bis die gesamte Fällung fast vollständig schwarz ist, und man erhält auf solche Weise eine sehr leicht filtrierbare Mischung. Das klare Filtrat wird nun durch Schwefelwasserstoff vollständig entbleit. Zur Umwandlung des in der klaren Lösung enthaltenen Gemenges von Kreatin und Kreatinin quantitativ in Kreatinin verfährt man in folgender Weise. Der Lösung werden entsprechend je 4 g des obigen Gemenges 50 ccm Normalschwefelsäure hinzugefügt, die Lösung 36 bis 48 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt und mit einer der Schwefelsäure entsprechenden Menge Bariumhydroxydlösung versetzt. Nach einer halben Stunde wird das Bariumsulfat abfiltriert, das Filtrat und Waschwasser rasch durch Kochen über freier Flamme eingeeengt, bis in der noch siedenden Flüssigkeit ein Teil des gelösten Kreatinins schon ausgefallen ist. Nach dem Erkalten ist die ganze Flüssigkeit gewöhnlich erstarrt. Die Mutterlauge wird auf dem Saugfilter abgesaugt und das Kreatinin mit kleinen Mengen Alkohol zwei- bis dreimal ausgewaschen. Durch zweimaliges Umkristallisieren ist das in dieser Weise erhaltene Kreatinin analysenrein.

Darstellungsmethode nach Jaffé¹⁾.

Man dampft den Harn auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz ein und erschöpft den Rückstand mit heißem Alkohol, wobei alles Kreatinin, sowie das dem Harn zugesetzte Kreatin in die alkoholische Lösung übergehen. Der Alkohol der vereinigten Auszüge wird verdunstet, der Rückstand in 150 ccm Wasser gelöst und mit Salzsäure am Rückflußkühler 4 Stunden erhitzt. Hierauf dampft man auf dem Wasserbade unter Erneuerung des verdampften Wassers, bis die freie Salzsäure entfernt ist, löst den Rückstand in Wasser, behandelt die Lösung mit Tierkohle, wäscht diese auf dem Filter mit heißem Wasser gründlich aus und verdampft das Filtrat unter Zusatz von Natriumazetat auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz. Der sirupöse Rückstand wird mit 60—100 ccm siedendem Alkohol extrahiert, filtriert, die Hälfte der Lösung mit dem gleichen Volumen gesättigter alkoholischer Pikrinsäurelösung versetzt, nach 24 stündigem Stehen vom

¹⁾ M. Jaffé, Untersuchungen über die Entstehung des Kreatins im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie 48, 430 (1906).

Niederschlag abfiltriert, dieser mit alkoholischer Pikrinsäurelösung, dann mit reinem Alkohol und mit Äther gewaschen und an der Luft getrocknet. Das Pikrat wird durch Erhitzen mit Salzsäure zersetzt, die durch Ausschütteln mit Äther von der Pikrinsäure befreite Lösung nach Zusatz von etwas Natriumazetat verdunstet und mit 30—50 ccm heißem Alkohol extrahiert. Das so erhaltene klare Filtrat gibt auf Zusatz von 15—20 Tropfen alkoholischer Chlorzinklösung und kräftigem Umrühren fast farblose kristallinische Ausscheidung von Kreatininchlorzink. Diese Methode liefert etwa 70 Proz. des zugesetzten Kreatins.

Quantitative Bestimmung¹⁾. Für die quantitative Bestimmung des Kreatinins eignet sich das von Neubauer angegebene Darstellungsverfahren, modifiziert von Salkowski²⁾, am besten die Folinsche Methode. 240 ccm von Eiweiß (durch Kochen mit Säurezusatz) und Zucker (durch Vergärung mit Hefe) befreiten Harnes werden mit Kalkmilch schwach alkalisch gemacht, mit Chlorkalzium gefällt und auf 300 ccm aufgefüllt. Nach etwa 15 Minuten wird der Niederschlag abfiltriert, vom Filtrate werden 25 ccm = 200 ccm Harn mit Essigsäure sehr schwach sauer gemacht, bis auf etwa 20 ccm eingedampft, mit Soda neutralisiert, mit etwa dem gleichen Volumen absoluten Alkohol durchgerührt und in einen etwas absoluten Alkohol enthaltenden, 100 ccm fassenden Meßkolben gebracht und mit Alkohol nachgespült. Die Mischung wird gut durchgeschüttelt, nach dem Erkalten mit absolutem Alkohol bis zur Marke aufgefüllt und 24 Stunden stehen gelassen. Hierauf filtriert man, mißt vom Filtrat 80 ccm = 160 ccm Harn in ein Becherglas ab, versetzt mit 0,5 — 1 ccm alkoholischer säurefreier Chlorzinklösung, bedeckt mit einem Uhrglas und läßt 3—4 Tage stehen, wobei sich Kristalldrüsen von Kreatininchlorzink ausscheiden. Diese werden auf einem getrockneten und gewogenen Filter gesammelt, nach vollständigem Abtropfen der Flüssigkeit mit etwas Alkohol bis zum vollständigen Verschwinden der Chlorreaktion nachgewaschen, dann bei 100° C getrocknet und gewogen, oder man bestimmt im Kreatininchlorzink den Stickstoff nach Kjeldahl und berechnet daraus die Kreatininmenge. 1 Teil Kreatininchlorzink entspricht 0,6242 Teilen Kreatinin.

Diese Methode gibt für menschlichen Harn zuverlässige Resultate, dagegen sind die Werte für Kaninchen- und Hundeharn nach der Angabe von Jaffé ungenau.

Kolorimetrische Methode von Folin.

Das Prinzip dieser Methode beruht auf Rotfärbung des Kreatinins mit alkalischer Pikrinsäurelösung; die Farbenintensität dieser Färbung wird in bestimmter Schichtlänge mit einer Standardlösung bestimmt.

Eine Lösung von 10 mg Pikrinsäurelösung, in 10 ccm Wasser mit 15 ccm einer gesättigten (etwa 1,2 Proz.) Pikrinsäurelösung und 4 bis

¹⁾ Jaffé, Zeitschr. f. physiol. Chem. **10**, 399 (1886).

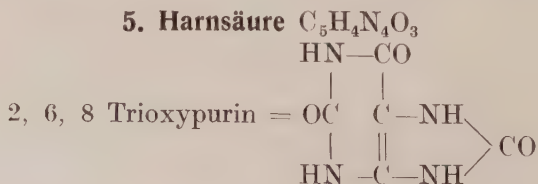
²⁾ Salkowski, Über die Neubauersche Methode zur Bestimmung des Kreatinins im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie **10**, 399 (1886); Beiträge zur Chemie des Harns **14**, 471 (1890).

9 ccm Natronlauge versetzt, gibt nach 5—10 Minuten die maximale Rotfärbung. Die in dieser Weise erhaltene Lösung gibt auf 500 ccm verdünnt eine Flüssigkeit, von der eine Schicht von 8,1 mm im durchfallenden Licht genau dieselbe Farbe hat, wie eine Schicht von 8 mm $\frac{1}{2}$ -Normalkaliumbichromat.

Man bringt $\frac{1}{2}$ -Normalkalibichromatlösung in das eine Rohr des Kolorimeters und stellt genau bis auf 8 mm ein, dann gießt man in das zweite Rohr von derselben Lösung und stellt beide Röhren auf Gleichheit ein. Das Mittel von 3—4 Beobachtungen darf nicht mehr als 0,1 mm vom richtigen Wert (8 mm) abweichen, und die Differenz zwischen je 2 Beobachtungen soll 0,3 mm nicht überschreiten, was nach einiger Übung leicht erreichbar ist. Man versetzt 10 ccm Harn in einem 500 ccm fassenden Meßkolben mit 15 ccm Pikrinsäurelösung, 5 ccm Natronlauge, schüttelt gut durch und füllt nach 5 Minuten langem Stehen bis zur Marke auf. Hierauf spült man das zweite Rohr des Kolorimeters mit dieser Lösung aus und bestimmt den kolorimetrischen Wert der Lösung wie vorher mittels der in dem anderen Rohr des Kolorimeters vorhandenen 8 mm-Kaliumbichromatlösung. Die Mengen Kreatinin sind aus dem kolorimetrischen Wert leicht zu berechnen. Haben beispielsweise 3 Bestimmungen die kolorimetrischen Werte 7,3 mm, 7,1 mm und 7,2 mm, im Mittel 7,2 mm, ergeben, so berechnet sich der Kreatiningehalt in 10 ccm Harn, da 8,1 mm 10 mg Kreatinin entspricht, demnach auf $\frac{8,1}{7,2} \cdot 10 = 11,25$ mg.

Je konzentrierter die Untersuchungslösung ist, um so schärfer läßt sie sich mit der Bichromatlösung vergleichen, um so geringer sind die Differenzen der Ablesung. Geben die kolorimetrischen Beobachtungen Werte unter 5 mm, dann wird die Bestimmung wiederholt mit nur 5 ccm Harn, oder 25 ccm Harn werden zuerst mit 25 ccm Wasser verdünnt, und die Bestimmung wird mit 10 ccm verdünnten Harns wiederholt, oder die Bestimmung wird mit 10 ccm des nicht verdünnten Harns unter Anwendung eines 1000-ccm-Meßkolbens wiederholt. Liefert die kolorimetrische Bestimmung Werte, die über 13 mm liegen, dann wird die Bestimmung mit 20 ccm Harn vorgenommen. Überhaupt sollen die zur Anwendung kommenden Mengen Harn 7—15 mg Kreatinin für 500 ccm Flüssigkeit enthalten.

Um das Kreatin neben dem Kreatinin zu bestimmen, stellt man zuerst den Gehalt an präformiertem Kreatinin fest und führt in einer anderen Harnprobe das Kreatin in Kreatinin über. Nach Folin erhitzt man 10 ccm Harn mit 5 ccm Normalsalzsäure auf dem Wasserbade 3 Stunden lang, wobei der Harn deutlich braun gefärbt wird. Diese Färbung wird jedoch beim Verdünnen auf 500 ccm bedeutend heller und stört die Bestimmung nicht. Die hier angewandte Säurekonzentration, sowie Erwärmungsdauer sind für Harn am geeignetsten.



Eigenschaften. Die reine Harnsäure stellt ein weißes, geruch- und geschmackloses Pulver dar, das aus kleinen rhombischen Prismen oder Täfelchen besteht. In unreinem Zustande bildet die Harnsäure größere und gefärbte Kristalle. Sie löst sich leicht in kochendem Glyzerin, sehr schwer in Wasser, ist unlöslich in Alkohol und Äther. In einer heißen Lösung von Natriumphosphat ist sie leicht löslich, und es entstehen bei einem Überschuß von Harnsäure Monophosphat und saures Urat. Man nimmt deshalb an, daß das Natriumphosphat als Lösungsmittel für die Harnsäure im Harn fungiere.

Nachweis. Versetzt man Harnsäure in Substanz in einer Porzellanschale mit ein paar Tropfen Salpetersäure und erwärmt, so löst sich die Harnsäure unter starker Gasentwicklung, und trocknet man nun die Flüssigkeit auf dem Wasserbade ein, so bleibt ein roter Rückstand, der durch Ammoniak schön purpurrot (Murexid) gefärbt wird. Wird der rote Rückstand nach dem Erkalten statt mit Ammoniak mit etwas Natronlauge versetzt, so färbt er sich blau oder blauviolett. Diese Reaktion wird Murexidprobe genannt.

Methode von Ludwig ¹⁾-Salkowski ²⁾.

Diese Methode besteht darin, daß man die Harnsäure mit Silbernitratlösung aus dem mit Magnesiamixtur versetzten Harne fällt und die aus der Silberfällung freigemachte Harnsäure wägt. Da man sich oft der Ludwigschen Methode allein bedient, werden hier beide getrennt angeführt.

Erforderliche Reagentien. 1. Ammoniakalische Silberlösung. Man löst 26 g Silbernitrat in überschüssigem Ammoniak und füllt die Lösung mit destilliertem Wasser zum Liter auf.

2. Magnesiamixtur. Man löst 100 g kristallisiertes Magnesiumchlorid in Wasser, setzt soviel Ammoniak hinzu, bis die Flüssigkeit stark danach riecht, dann 200 g Ammoniumchlorid, schüttelt um und füllt zum Liter auf.

3. Natriumsulfidlösung. Man löst 10 g reines Ätznatron im Liter Wasser, sättigt die Hälfte dieser Lösung mit Schwefelwasserstoff und vereinigt beide Lösungen.

a) Man versetzt 10—20 ccm Silberlösung und 10—20 ccm Magnesiamixtur mit so viel Ammoniak, bis das Gemenge klar geworden ist. Diese Lösung wird mit 100—200 ccm Harn unter Umrühren vermischt und eine Stunde stehen gelassen. Der ausgeschiedene Niederschlag wird abfiltriert, mit ammoniakhaltigem Wasser nachgewaschen und in das Becherglas mit Wasser quantitativ übergespült. Hierauf versetzt man den Niederschlag mit 20 ccm kochend heißer, mit ebensoviel Wasser verdünnter Natriumsulfidlösung und erwärmt unter Umrühren im Wasserbade einige Zeit. Die abgekühlte Flüssigkeit wird in eine Porzellanschale filtriert, der Rückstand mit heißem Wasser gewaschen, das Filtrat mit Salzsäure angesäuert, auf etwa 15 ccm eingedampft und nach Zusatz von einigen Tropfen Salzsäure 24 Stunden stehen gelassen. Die ausgeschiedenen Kristalle der Harnsäure werden nun auf einem getrockneten und gewogenen Filter gesammelt, mit Wasser, Alkohol, Äther, Schwefelkohlenstoff und zuletzt wieder mit Äther ausgewaschen, bei 100—110° C getrocknet und gewogen. Für je 10 ccm des wässerigen Filtrates müssen der direkt gefundenen Harnsäuremenge 0,00048 g hinzuaddiert werden.

¹⁾ Ludwig, Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Harnsäure. Wiener Mediz. Jahrb. 1884, 597.

²⁾ Salkowski, Über die Bestimmung der Harnsäure und Xanthinkörper im Harn. Virchows Archiv 50, 193 (1870); 52, 60.

b) Die Modifikation von Salkowski besteht darin, daß man 200 ccm Harn mit 50 ccm Magnesiamixtur fällt, mit Wasser auf 300 ccm auffüllt, filtriert und 200 ccm des Filtrates mit 10—15 ccm einer 3 prozentigen Silbernitratlösung fällt. Der Silberniederschlag wird nun mit 200 bis 300 ccm mit einigen Tropfen Salzsäure angesäuertem Wasser aufgeschlemmt, mit Schwefelwasserstoff versetzt, dann zum Sieden erhitzt, das Schwefelsilber mit Wasser ausgekocht, filtriert, bis auf wenige Kubikzentimeter konzentriert, mit 5—8 Tropfen Salzsäure versetzt und bis zum nächsten Tage stehen gelassen.

Methode nach Hopkins ¹⁾.

Diese Methode basiert auf der vollständigen Fällung der Harnsäure als Ammoniumurat bei Sättigung des Harns mit Ammoniumchlorid.

100 ccm Harn werden in einem Erlenmeyerkolben mit 30 g Ammoniumchlorid versetzt und 1—2 Stunden unter Umschütteln stehen gelassen. Hierauf filtriert man und wäscht den Niederschlag mit Ammoniumsulfat aus. Das so erhaltene Ammoniumurat wird in ein Becherglas quantitativ übergespült und mit salzsäurehaltigem Wasser erhitzt, wodurch es in freie Harnsäure umgewandelt wird. Die Harnsäure wird dann entweder durch Wägung oder durch Titration mit konzentrierter Schwefelsäure (20 g) und $\frac{1}{20}$ Normalkaliumpermanganatlösung (1,582 g Kaliumpermanganat in 1 Liter Wasser) bestimmt. 1 ccm Permanganatlösung entspricht 3,75 mg Harnsäure.

Wörners Modifikation ²⁾.

Man erwärmt 150 ccm einer 24 stündigen gut durchmischten Harnprobe, deren Azidität nicht mehr als 3 ccm Normalsäure entsprechen darf, auf 40—45° C, versetzt mit einer Lösung von 30 g Ammoniumchlorid in 100 ccm Wasser und läßt etwa eine Stunde stehen. Die trübe Flüssigkeit dekantiert man von dem ausgeschiedenen harnsauren Ammonium durch ein gehärtetes Filter, bringt den Niederschlag auf das Filter und wäscht ihn mit zehnprozentiger Ammoniumsulfatlösung aus, bis er chlorfrei ist (d. h. mit salpetersäurehaltiger Silbernitratlösung keinen weißen flockigen Niederschlag mehr gibt). Der so ausgewaschene Niederschlag wird auf dem Filter in ein- bis zweiprozentiger Natronlauge gelöst und mit heißem Wasser nachgewaschen. Das Filter dampft man auf dem Wasserbade so lange ein, bis kein Ammoniak mehr entweicht (rotes Lackmuspapier darf von den Dämpfen nicht blau gefärbt werden) und bestimmt darin den Stickstoff nach Kjeldahl. 1 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalschwefelsäure = 0,0042 g Harnsäure.

¹⁾ G. Hopkins, Bestimmung der Harnsäure im Harn. Proc. of the Royal Soc. 52, 93 (1892).

²⁾ E. Wörner, Ein einfaches Verfahren zur Bestimmung der Harnsäure auf Grund der Fällung als Ammonurat. Zeitschr. f. physiol. Chemie 29, 70 (1900).

Methode von Folin und Schaffer¹⁾.

Nach dieser Methode verfährt man in der Weise, daß man 300 ccm mit 75 ccm einer Lösung versetzt, die im Liter 500 g Ammoniumsulfat, 5 g Uranazetat und 60 ccm 10 prozentiger Essigsäure enthält, wobei ein Niederschlag entsteht, der nach 5 Minuten abfiltriert wird. Hierauf versetzt man 125 ccm vom Filtrate = 100 ccm Harn, läßt 24 Stunden stehen, filtriert den Niederschlag ab, wäscht ihn mit Ammoniumsulfat bis zum Verschwinden der Chlorreaktion aus. Den Niederschlag spült man mit 100 ccm Wasser in einen Kolben über, fügt 15 ccm konzentrierter Schwefelsäure hinzu und titriert bei 60—63° C mit $\frac{1}{20}$ -Normalkaliumpermanganatlösung, von der 1 ccm 3,75 mg Harnsäure entspricht. Unter Berücksichtigung der Löslichkeit des Ammoniumurates addiert man für je 100 ccm Harn eine Korrektur von 3 mg Harnsäure hinzu.

Kupfersulfat-Bisulfitmethode von Krüger und Schmid²⁾.

Nach dieser Methode werden die Harnsäure und die Purinbasen mit Kupfersulfatlösung und Natriumbisulfit gemeinsam als Kupferoxydulverbindungen ausgefällt, die durch Schwefelnatrium zersetzt werden. Aus der konzentrierten wässrigen Lösung wird die Harnsäure mit Salzsäure gefällt. In dem Filtrate der Harnsäure erhält man die Purinbasen als Kupferoxydul- oder Silberverbindungen.

Erforderliche Lösungen. 1. Eine 40prozentige Natriumbisulfitlösung. 2. 10prozentige Kupfersulfatlösung. 3. Natriumsulfidlösung; 500 ccm einer 1prozentigen reinen Natronlauge werden mit Schwefelwasserstoff gesättigt und mit derselben Natronlauge zum Liter aufgefüllt. 4. Natriumazetat in Substanz.

Der zu untersuchende Harn muß eiweißfrei sein, ein etwaiger Niederschlag von Uraten oder Harnsäure wird mit Natronlauge gelöst. Man versetzt 400 ccm Harn in einem Literkolben mit 24 g Natriumazetat und 40 ccm Natriumbisulfitlösung, erhitzt zum Sieden, fügt je nach dem Puringehalt 40—80 ccm Kupfersulfatlösung hinzu, erhält im Sieden 3 Minuten, wobei sich ein flockiger Niederschlag ausscheidet, der durch ein Faltenfilter abfiltriert, mit heißem Wasser ausgewaschen, bis das Filtrat farblos abläuft und in denselben Kolben mit heißem Wasser zurückgespült wird. Hierauf versetzt man den Niederschlag mit etwa 200 ccm Wasser, erhitzt zum Sieden und fügt 30 ccm Natriumsulfidlösung hinzu, wodurch eine Fällung entsteht, die dann vollständig ist, wenn ein Tropfen der Flüssigkeit auf ein mit Bleiazetat befeuchtetes Stück Filtrierpapier eine Braunfärbung hervorruft; ist dies nicht der Fall, so muß man noch Natriumsulfidlösung hinzufügen. Nun säuert man mit Essigsäure an, erhitzt so lange, bis der ausgeschiedene Schwefel

¹⁾ O. Folin, Eine Vereinfachung der Hopkinschen Methode. *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **24**, 224 (1898). — O. Folin und Ph. Schaffer, Über die quantitative Bestimmung der Harnsäure im Harn. *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **32**, 552 (1900).

²⁾ M. Krüger, Über die Fällbarkeit der Harnsäure und der Basen der Harnsäuregruppe als Kupferoxydulverbindungen. *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **18**, 351 (1894). — M. Krüger und J. Schmid, Die Bestimmung der Harnsäure und Purinbasen im menschlichen Harn. *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **45**, 1 (1905).

sich zusammenballt, filtriert heiß, wäscht mit heißem Wasser nach, setzt 10 ccm einer 10 prozentigen Sodalösung hinzu und dampft in einer Porzellanschale bis auf 10 ccm ein, wobei sich die Harnsäure kristallinisch ausscheidet, während die Purinbasen in Lösung bleiben. Nach 2—3 Stunden sammelt man die ausgeschiedene Harnsäure auf einem Filter, wäscht mit schwefelsäurehaltigem Wasser nach, bis Filtrat und Waschwasser zusammen etwa 75 ccm betragen, und bestimmt in der so erhaltenen Harnsäure den Stickstoffgehalt. Der gefundene Stickstoffwert, mit 3 multipliziert, gibt die Menge Harnsäure an, zu der man noch 3,5 mg (für die in 75 ccm Filtrat gelöste Harnsäure) hinzuaddieren muß.

6. Purinbasen (Alloxurbasen).

Im Menschenharn sind folgende Purinbasen gefunden worden: Xanthin, Guanin, Hypoxanthin, Adenin, Paraxanthin, Heteroxanthin, Episarkin, Epiguanin, 1-Methylxanthin und Karnin.

Quantitative Bestimmung nach Salkowski¹⁾. 400—600 ccm eiweißfreien Harnes werden mit 100—150 ccm Magnesiamixtur versetzt, auf 500—700 ccm mit Wasser aufgefüllt, filtriert und 300 resp. 500 ccm Filtrat mit 20—30 ccm einer 3 prozentigen Silbernitratlösung gefällt und filtriert. Den ausgewaschenen Niederschlag schlemmt man mit 600—800 ccm Wasser unter Zusatz von einigen Tropfen Salzsäure auf, leitet Schwefelwasserstoff ein, erhitzt zum Sieden, filtriert heiß und dampft auf dem Wasserbade zur Trockne ein. Der Rückstand wird mit 25—30 ccm heißer 3 prozentiger Schwefelsäure behandelt, 24 Stunden stehen gelassen, von der Harnsäure abfiltriert, Filtrat ammoniakalisch gemacht und die Purinbasen mit Silbernitrat ausgefällt. Der so ausgeschiedene Niederschlag wird auf ein kleines Filter gebracht, gut ausgewaschen, vorsichtig verascht, die Asche in Salpetersäure gelöst und mit Rhodanammium nach Volhard titriert, die im Liter 1,2—1,4 g enthält und 0,277 g Purinbasenstickstoff resp. 0,7381 g Purinbasen entspricht.

Kupfersulfat-Bisulfitmethode von Krüger und Schmid²⁾

Erforderliche Lösungen. Eine Aufschwemmung von Braunstein, eine heiße 0,5 prozentige Lösung von Kaliumpermanganat wird mit Alkohol bis zur Entfärbung versetzt. Vor dem Gebrauch umschütteln.

In dem bei der Bestimmung der Harnsäure erhaltenen Filtrate werden die Purinbasen in folgender Weise bestimmt;

a) Durch Kupfersulfatfällung. Das Filtrat wird zuerst mit Natronlauge alkalisch und dann mit Essigsäure wieder sauer gemacht. Dann erwärmt man das Filtrat auf 70—80° C, versetzt es mit $\frac{1}{2}$ —1 ccm 10 prozentiger Essigsäure und 10 ccm Braunsteinlösung und schüttelt gut durch, um die noch vorhandene Harnsäure zu oxydieren. Um den überschüssigen Braunstein zu lösen, fügt man 10 ccm Natriumbisulfatlösung und dann 5—10 Proz. der 10 prozentigen Kupfersulfatlösung hinzu, erhitzt die Flüssigkeit und läßt drei Minuten kochen, filtriert durch ein kleines Filter, wäscht mit Wasser aus und bestimmt im Niederschlag den Stickstoffgehalt nach Kjeldahl.

b) Durch Silbernitratfällung. Erforderliche Lösungen: 1. Ammoniakalische Silberlösung: Man löst 26 g Silbernitrat in überschüssigem Ammoniak und füllt die Lösung mit Wasser zum Liter auf. 2. Magnesiamischung: Man löst 100 g kristallinisches Magnesiumchlorid in Wasser, fügt so viel Ammoniak hinzu, bis die Flüssigkeit stark danach riecht, und 200 g Ammoniumchlorid, schüttelt um und füllt zum Liter auf. 3. Eine 6 prozentige Dinatriumphosphatlösung.

Zunächst verfährt man in derselben Weise wie unter a), dann macht man die

¹⁾ Salkowski, Pflügers Archiv 69.

²⁾ M. Krüger und J. Schmid, Die Bestimmung der Harnsäure und Purinbasen im menschlichen Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie 45, 1 (1905).

den überschüssigen Braunstein enthaltende essigsäure Lösung ammoniakalisch, fügt 10 ccm der ammoniakalischen Silbernitratlösung und Ammoniak bis zur vollständigen Auflösung des ausgeschiedenen Chlorsilbers, ferner 10 ccm Dinatriumphosphatlösung und 5 ccm der Magnesiamixtur hinzu und läßt 2 Stunden stehen. Hierauf filtriert man, wäscht den Niederschlag auf dem Filter mit heißem Wasser bis zum Verschwinden des Ammoniaks, vertreibt den Rest des Ammoniaks durch Erhitzen mit Magnesia usw. und bestimmt den Stickstoff nach Kjeldahl.

Trennung der Purinbasen¹⁾.

a) Fällt man die Purinbasen mit ammoniakalischer Silberlösung, so bringt man den ausgewaschenen Niederschlag in einen Rundkolben, versetzt mit verdünnter Salzsäure und erwärmt auf dem Wasserbade so lange, bis der voluminöse Niederschlag der Silberverbindungen verschwindet und an seiner Stelle das entstandene Chlorsilber zu Boden fällt. Hierauf wird der Kolben über freier Flamme erhitzt, versetzt mit der gleichen Menge Salzsäure wie zuvor, filtriert und wäscht den Niederschlag mit stark verdünnter Salzsäure aus.

b) Sind die Purinkörper mit Kupfersulfat und Natriumbisulfid gefällt worden, so erwärmt man den Niederschlag im Rundkolben mit Wasser, macht die Lösung schwach ammoniakalisch und dann mit Salzsäure stark sauer, leitet Schwefelwasserstoffgas darüber und filtriert heiß.

Das nach a oder b erhaltene Filtrat wird auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz eingedampft, zum Schluß bei niedriger Temperatur unter Darüberleiten eines starken Luftstromes. Der Rückstand wird nun zweimal mit Wasser und dann mit 96prozentigem Alkohol eingedampft, bis die Masse grobpulverig geworden ist, um die Hauptmenge der Salzsäure zu entfernen. Der Rest der Salzsäure wird entfernt, indem man die Masse mit Wasser bei 40° C digeriert, einige Stunden stehen läßt, filtriert und zuerst mit Wasser, dann mit Alkohol und Äther auswäscht. Dampft man das Filtrat ein und verfährt in derselben Weise, so bleibt beim Digerieren mit Wasser ein geringer Rückstand, der mit der Hauptmenge vereinigt wird.

Der Rückstand besteht aus Xanthin, Heteroxanthin und 1-Methylxanthin, und die Lösung enthält Epiguanin, Adenin, Hypoxanthin und Paraxanthin. Nach Salomon bezeichnet man den Rückstand als Xanthinfraktion und die Lösung Hypoxanthinfraktion.

A. Xanthinfraktion. Man löst die drei Basen in der 15fachen Menge 3,3prozentiger, salzsäurefreier heißer Natronlauge und läßt 24 Stunden stehen, wobei sich das Natriumsalz des Heteroxanthins in reinem Zustande und fast quantitativ ausscheidet. Je 60 ccm des auf 60° C erwärmten Filtrates vermischt man unter Umrühren mit einem (vorher aufgekochten) kalten Gemisch aus 20 ccm konzentrierter Salpetersäure und 20 ccm Wasser, um den Rest der mit den Purinbasen in Lösung gegangenen Harnsäure zu zersetzen, und läßt in der Kälte stehen, wobei sich nach mehreren Stunden salpetersaures Xanthin ausscheidet. Ist das so erhaltene salpetersaure Xanthin noch nicht vollständig rein (mikroskopisches Bild), so neutralisiert man je 3 g der lufttrocknen Substanz in wenig Wasser, suspendiert mit Natronlauge und erwärmt, wobei freies Xanthin entsteht, das man durch Zusatz von Natronlauge löst, auf 60 ccm auffüllt und behandelt wie oben. Das salpetersaure Xanthin scheidet sich in Drusen aus glänzenden dünnen, großen rhombischen Platten aus. Die freie Base erhält man in Form von amorphen Krusten durch Eindampfen der ammoniakalischen Lösung des Nitrates. Das 1-Methylxanthin erhält man aus dem salpetersauren Filtrate vom Xanthinnitrat durch Übersättigen mit Ammoniak und Eindampfen als atlasglänzende Masse, die aus mikroskopischen Blättchen besteht.

B. Hypoxanthinfraktion. Beim Versetzen der salzsauren Lösung mit Ammoniak im Überschuß scheiden sich kleine glänzende Prismen des Epiguanins aus. Das zum Verjagen des Ammoniaks erhitzte Filtrat wird nach dem Erkalten mit einer 1,1prozentigen Pikrinsäurelösung in geringem Überschuß versetzt und das ausgeschiedene Adeninpikrat schnell abfiltriert. Das Filtrat wird mit Schwefelsäure versetzt, die darin enthaltene überschüssige

¹⁾ M. Krüger und G. Salomon, Die Alloxurbasen des Harnes. Zeitschr. f. physiol. Chemie 26, 350 (1898/99).

7. Oxalsäure $C_2H_2O_4$.



Eigenschaften. Die Oxalsäure kristallisiert mit 2 Mol. Wasser in monoklinen Prismen, die leicht in Wasser und Alkohol, schwerer in Äther löslich sind, bei $101^\circ C$ schmelzen und an der Luft verwittern. Durch längeres Erhitzen verliert sie das Wasser und schmilzt dann bei $189^\circ C$; bei vorsichtigem Erwärmen auf $150^\circ C$ sublimiert sie.

Nachweis. Versetzt man eine kochende 0,1prozentige Kaliumoxalatlösung mit 1—2 Tropfen Eisenchlorid, so scheidet sich ein Niederschlag aus, der dem Eisenhydroxyd ähnlich ist, sich in Essigsäure schwer, aber in Ammoniak, Natronlauge und Sodalösung leicht löst. Fügt man zu 2 ccm einer 25prozentigen Oxalsäurelösung 4 Tropfen einer 5prozentigen Eisenchloridlösung, so entsteht eine hellgrüne Färbung; neutrales Oxalat färbt sich grün.

Quantitative Bestimmung. Nach Salkowski¹⁾ dampft man 500 ccm frischen Harn auf etwa $\frac{1}{3}$ ein, säuert nach dem Erkalten mit 20 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,12 an und schüttelt in einem Scheidetrichter dreimal mit je 200 ccm eines Gemisches von 9 Volum. Äther und 1 Volum. Alkohol aus. Die vereinigten filtrierten Ätherauszüge werden unter Zusatz von wenig Wasser abdestilliert, wobei noch alkoholhaltige Flüssigkeit zurückbleibt, die dann in einer Schale unter Wasserzusatz zur Vorbeugung einer Bildung von flüchtigen Oxalsäureestern bis auf 20 ccm eingedampft wird. Beim Eindampfen scheiden sich harzige Massen aus, die man nach dem Erkalten auf ein kleines Filter bringt und zweimal mit Wasser auswäscht. Hierauf macht man das Filtrat mit Ammoniak schwach alkalisch, versetzt mit 2—3 ccm einer 10 prozentigen Chlorkalziumlösung, säuert mit Essigsäure an und läßt 12—24 Stunden stehen. Das ausgeschiedene Kalziumoxalat bringt man auf ein aschefreies Filter, glüht in einem Platintiegel bis zur Gewichtskonstanz und wägt nach dem Erkalten im Exsikkator. Das Gewicht des gefundenen Kalziumoxyds, mit 1,6075 multipliziert, gibt die Menge Oxalsäure.

Schreiber und Hüne²⁾ modifizieren die Methode von Salkowski, indem sie 200—400 ccm Harn mit 5 ccm einer 10 prozentigen Chlorkalziumlösung und Ammoniak bis zur alkalischen Reaktio n versetzen und dann mit Essigsäure schwach ansäuern, wobei ein Überschuß von Essigsäure vermieden wurde, da sonst Oxalsäure wieder in Lösung gehen kann. Dann fügen sie etwas alkoholische Thymollösung hinzu, um ein Wachsen von Bakterien zu verhindern und lassen 24 Stunden stehen, wobei sich ein Niederschlag ausscheidet. Dieser wird nun auf einem Filter gesammelt und samt Filter im Schütteltrichter unter Zusatz von 3 ccm konzentrierter Salzsäure zweimal je 10 Minuten lang mit je 100 ccm Äther, der 5—10 Proz. Alkohol enthält, ausgeschüttelt, die Ätherauszüge filtriert und genau nach Salkowski weiter behandelt.

Methode von Autenrieth und Barth³⁾. Man versetzt den

¹⁾ E. Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chemie 29, 437 (1900).

²⁾ W. Hüne, Über die quantitative Bestimmung der Oxalsäure im Harn. Dissertation. Göttingen 1901.

³⁾ W. Autenrieth und H. Barth, Zeitschr. f. physiol. Chemie 35, 327 (1902).

zu untersuchenden Harn mit einem Überschuß von Ammoniak und Kalziumchlorid, wobei ein Niederschlag entsteht, der am anderen Tage abfiltriert wird; das Filtrat muß klar sein. Hierauf löst man den Niederschlag in wenig Salzsäure und schüttelt die Lösung 4—5 mal mit je 150—200 ccm Äther, der 3 Proz. absoluten Alkohol enthält, aus. Die filtrierten Ätherauszüge werden mit 5 ccm Wasser versetzt und destilliert, wobei eine gefärbte Flüssigkeit zurückbleibt, die durch Tierkohle entfärbt wird. Die entfärbte Flüssigkeit fällt man dann mit Kalziumchlorid und Ammoniak, säuert nach einigem Stehen mit Essigsäure schwach an, glüht das ausgeschiedene Kalziumoxalat bis zur Gewichtskonstanz und wägt als Kalziumoxyd.

Nach den Untersuchungen von Mac Lean¹⁾ liefert die Methode von Autenrieth und Barth keine genauen Resultate, weil die Fällung des Kalziumoxalats in dem nicht verdünnten Harne nicht quantitativ stattfindet.

Albahary²⁾ empfiehlt zur Bestimmung der Oxalsäure, den Harn von 24 Stunden mit 50 ccm einer 10 prozentigen Sodalösung zu versetzen, auf dem Wasserbade bis auf ein Drittel seines Volumens einzudampfen, dann 20 ccm einer Lösung, die in 100 Teilen 10 Teile Magnesiumchlorid und 20 Teile Ammoniumchlorid enthält, und mit Säure gewaschene Tierkohle zuzufügen, weiter bis auf $\frac{1}{4}$ des ursprünglichen Volumens einzudampfen und noch heiß zu filtrieren. Das Filtrat wird nun mit Ammoniak stark alkalisch gemacht, nach 12 stündigem Stehen filtriert, mit einem geringen Überschuß von Kalziumchlorid versetzt, mit Essigsäure schwach sauer gemacht und 12 Stunden an einem warmen Orte stehen gelassen, wobei die Oxalsäure als Kalziumsalz ausfällt und in der üblichen Weise bestimmt wird.

Das Kalziumoxalat kann auch titrimetrisch bestimmt werden, indem man es in verdünnter Schwefelsäure löst, auf 300 ccm verdünnt und einen aliquoten, genau gemessenen Teil auf 50° C erwärmt und mit $\frac{1}{10}$ -Normalkaliumpermanganatlösung titriert, wobei die Reaktion sich im Sinne folgender Gleichung vollzieht:

$5 \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 + 2 \text{KMnO}_4 + 3 \text{H}_2\text{SO}_4 = \text{K}_2\text{SO}_4 + 2 \text{MnSO}_4 + 8 \text{H}_2\text{O} + 10 \text{CO}_2$.
Die gewichtsanalytische Bestimmung ist selbstverständlich genauer.

Nach Salkowski ist ein starkes Eindampfen des Harnes zu vermeiden, da Oxalsäure mit dem Harnstoff Oxalursäure bildet, die dann vom Äther nicht aufgenommen wird und ein Teil der Oxalsäure sich auf solche Weise dem Nachweise entzieht.

Oxalursäure $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_4$.



Die freie Oxalursäure ist ein in Wasser schwer lösliches Kristallpulver von saurem Geschmack; durch Kochen zerfällt sie in Harnstoff und Oxalsäure.

Nachweis. Für den Nachweis der Oxalursäure im Harne muß sie oder

¹⁾ H. Mac Lean, Über die quantitative Bestimmung der Oxalsäure im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie 60, 20 (1909).

²⁾ Albahary, Compt. rend. de l'Acad. des Sc. 136, 1681 (1903).

eine ihrer Verbindungen isoliert und durch folgende Reaktion identifiziert werden:

Wird eine Lösung von oxalursauem Ammoniak mit Chlorkalzium und Ammoniak versetzt und erhitzt, so scheidet sich noch weit vor der Siedehitze bei genügender Verdünnung oxalsaurer Kalk in schönen mikroskopischen Oktaedern aus. Versetzt man eine wässrige verdünnte Lösung von oxalursauem Ammoniak mit Kalziumchlorid oder Zinkchlorid und Ammoniak, so bleibt die Lösung klar und scheidet erst nach längerem Stehen die Salze dieser Basen aus.

Eine heiße wässrige Lösung gibt mit salpetersauem Silber einen nach dem Erkalten sich in seideglänzenden Nadeln ausscheidenden Niederschlag von oxalursauem Silber, das in heißem Wasser oder Ammoniak löslich ist und mit verdünnter Salpetersäure einen feinpulverigen kristallinischen Niederschlag von Oxalursäure gibt.

Darstellung. Neubauer isolierte die Oxalursäure aus dem Harn in folgender Weise. 100—150 Liter Harn filtriert man langsam durch eine hohe Schicht fein gekörnter Tierkohle, die sich in einer pipettenartiggeformten, unten ausgezogenen Glasröhre befindet und mit einem Stück Leinwand bedeckt ist, das zum Zurückhalten von Epithelien, Schleim usw. dient. Durch einen Quetschhahn reguliert man das Auftropfen des Harns in der Weise, daß in 24 Stunden etwa 20 Liter Harn die Kohle passieren. Sobald die entfärbende Kraft der Kohle erschöpft ist, füllt man die Pipette mit neuer Kohle. Die mit Farbstoff usw. beladene Kohle wäscht man mit destilliertem Wasser so lange aus, bis das Filtrat vom Chlor und von der Phosphorsäure befreit ist, trocknet sie an der Luft und kocht dann mit Alkohol aus, bis dieser sich nicht mehr färbt. Von den alkoholischen Filtraten wird der größte Teil Alkohol abdestilliert, der Rest in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade verdampft, der Rückstand mit warmem Wasser behandelt, die so erhaltene wässrige Lösung von der ungelösten fettigen Masse abfiltriert, das Filtrat bis zur Sirupkonsistenz eingedampft und in der Kälte stehen gelassen, wobei sich das oxalursauere Ammoniak kristallinisch ausscheidet. Am zweckmäßigsten reinigt man das so erhaltene Salz durch Dialyse, indem man das Dialysat eindampft, die sich dabei ausscheidenden Kristalle des oxalursauen Ammoniums mit absolutem Alkohol wäscht und aus heißem Wasser mit etwas reiner Tierkohle umkristallisiert.

8. Allantoin $C^2H_6N_4O_3$.



Eigenschaften. Das Allantoin bildet farblose, zu sternförmigen Drusen vereinigte Prismen, die in kaltem Wasser schwer, in kochendem und auch in heißem Alkohol leicht, in Äther nicht löslich sind. Mit Silbernitrat und etwas Ammoniak versetzt, gibt eine wässrige Allantoinlösung einen in überschüssigem Ammoniak löslichen weißen, flockigen Niederschlag, der sich nach kurzer Zeit in durchsichtige mikroskopische Tröpfchen verwandelt.

Nachweis und quantitative Bestimmung. Nach Loewy verfährt man in der Weise, daß man den schwach sauren Harn mit Merkurinitratlösung fällt, filtriert, das überschüssige Quecksilber mit Schwefelwasserstoff entfernt, das Filtrat erhitzt, bis es nicht mehr nach Schwefelwasserstoff riecht und mit Magnesiumoxyd und Silbernitrat

fällt. Der ausgeschiedene Niederschlag wird abfiltriert, ausgewaschen, in warmem Wasser mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in heißem Wasser gelöst, mit Merkurinitrat gefällt, der ausgewaschene Niederschlag in Wasser mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat etwas eingeeengt, wobei sich das Allantoin in Kristallen ausscheidet.

Bestimmung des Allantoins im Tierharn nach Wiechowski ¹⁾.

Das Prinzip der Methode besteht darin, daß das Allantoin durch Quecksilberazetat bei Gegenwart eines Überschusses an Natriumazetat quantitativ gefällt wird.

Erforderliche Lösungen. Quecksilberazetatlösung wird in der Weise dargestellt, daß man Quecksilberazetat in Wasser im Verhältnis von 1 : 100 löst, mit Natriumazetat bis zur Sättigung versetzt und mit Wasser so verdünnt, daß die Lösung 0,5 Proz. Quecksilberazetat enthält.

100 ccm der auf ein bestimmtes Volumen verdünnten Tagesmenge versetzt man in einem 250—300 ccm fassenden Meßkolben mit 10 ccm einer 8 prozentigen Schwefelsäure, mit einer genügenden Menge 10 prozentiger Phosphorwolframsäure und füllt mit Wasser bis zur Marke auf. Nach einer Stunde filtriert man die Lösung vom ausgeschiedenen Niederschlag in eine Schale ab, verreibt das Filtrat mit Bleikarbonat, bis die Kohlensäureentwicklung aufhört und die Reaktion nur noch schwach oder nicht mehr sauer ist. Die ungelösten Bleisalze werden abgenutscht, das Filtrat in einem Meßkolben durch eine ausreichende Menge Bleiessiglösung gefällt und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt (möglichst großes Volumen). Hierauf filtriert man von der Bleifällung ab, behandelt das Filtrat mit Schwefelwasserstoff, filtriert vom ausgeschiedenen Bleisulfid ab und verjagt den Schwefelwasserstoff aus dem Filtrat mittels der Luftpumpe. In Gegenwart von Chlor wird ein aliquoter Teil (genau gemessen) des von freier Essigsäure sauren Filtrates in einem Meßkolben mit Silberazetat versetzt, um das Chlor zu entfernen, und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Dann filtriert man, behandelt das Filtrat mit Schwefelwasserstoff, filtriert vom Silbersulfid ab und verjagt den Schwefelwasserstoff mittels der Luftpumpe. Dieses essigsäure Filtrat darf auf Zusatz von Phosphorwolframsäure, Bleiessig und Silbernitrat keine Fällung geben. In zwei aliquoten, genau abgemessenen Teilen dieses Filtrates fällt man, nachdem man mit chlorfreier Natronlauge aufs genaueste neutralisiert hat, das Allantoin mit einer genügenden Menge Quecksilberazetat-Natriumazetatlösung, läßt eine Stunde stehen, filtriert und wäscht mit Wasser aus, bis zum Verschwinden der Gelbfärbung des Filtrates durch Schwefelnatrium. In dem so erhaltenen Niederschlag bestimmt man den Stickstoffgehalt nach Kjeldahl und berechnet daraus die Menge des Allantoins unter Berücksichtigung der angewandten verschiedenen Volumina.

Den Niederschlag der zweiten Probe bringt man in ein Becherglas mit

¹⁾ W. Wiechowski, Die Bedeutung des Allantoins im Harnsäurestoffwechsel. Hofmeisters Beiträge 9, 109 (1908).

Wasser, erhitzt zum Sieden und leitet Schwefelwasserstoff durch, bis der Niederschlag vollständig zersetzt ist. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit Wasser digeriert, mit Wasser auf 25—50 cm aufgefüllt und durch ein dichtes Filter so oft filtriert, bis die Lösung vollständig klar abläuft. In einem aliquoten Teil dieser Lösung wird die Trockensubstanz bei 100° C bestimmt und auf die Gesamtmenge berechnet unter Berücksichtigung der verschiedenen Volumina.

Bestimmung des Allantoins im Menschenharn nach Wiechowski ¹⁾.

Sämtliche zur Verfügung stehende Harnmenge²⁾ wird zum dünnen Sirup auf dem Wasserbade konzentriert, zur Entfernung des Ammoniaks mit viel Magnesiumoxyd verrührt, mit dem mehrfachen Volumen Alkohol versetzt, vom Unlöslichen abgenutscht, mit Alkohol nachgewaschen und das Filtrat bis fast zur Trockne eingedampft. Der in wenig Wasser gelöste Rückstand wird mit Merkurinitrat unter Vermeidung eines zu großen Überschusses gefällt und sorgfältig ausgewaschen. Das Filtrat wird durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit, das Quecksilbersulfid abfiltriert, gut ausgewaschen und das so erhaltene mit chlorfreiem Natriumkarbonat neutralisierte Filtrat mit 20 prozentiger Merkurinitratlösung gefällt. Den Niederschlag läßt man 24 Stunden stehen, sammelt ihn auf einem Filter, wäscht mit Wasser mehrmals aus, verteilt in Wasser und leitet in der Kälte Schwefelwasserstoff ein, filtriert das ausgeschiedene Quecksilbersulfid ab und wäscht gut nach. Das Filtrat wird dann unter Zusatz von Bariumkarbonat eingeeengt und die Behandlung mit Magnesiumoxyd und Alkohol zur völligen Entfernung des Ammoniaks wiederholt. Die noch dunkelgefärbte Lösung des Rückstandes wird mit 50 prozentiger Phosphorwolframsäurelösung und 10 prozentiger Schwefelsäure gefällt, filtriert, Niederschlag mit 5 prozentiger Phosphorwolframsäurelösung ausgewaschen, Filtrat nach Neutralisation durch Bleioxyd mit Bleiessig gefällt. Der Niederschlag wird abgenutscht und gewaschen, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit, der Schwefelwasserstoff verjagt, Filtrat vom ausgeschiedenen Bleisulfid mit Sodalösung genau neutralisiert und mit überschüssigem Quecksilberazetatgemisch gefällt. Der auf einem Filter gesammelte Niederschlag wird so lange ausgewaschen, bis das Filtrat nicht mehr mit Merkurinitrat reagiert. Der Niederschlag wird unter Wasser mit Schwefelwasserstoff in der Hitze zerlegt, die Flüssigkeit mit dem kolloidalen Quecksilbersulfid in einer Schale auf dem Wasserbade bis zur Trockne verdampft, wobei das Quecksilbersulfid ausflockt.

¹⁾ W. Wiechowski, Über die Zersetzlichkeit der Harnsäure im menschlichen Organismus. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 60, 193 (1909). — Das Vorhandensein von Allantoin im normalen Menschenharn und seine Bedeutung für die Beurteilung des menschlichen Harnsäurestoffwechsels. Biochem. Zeitschr. 19, 368 (1909).

²⁾ A. Schittenhelm und K. Wiener, Über das Vorkommen und die Bedeutung von Allantoin im menschlichen Urin. Zeitschr. f. physiol. Chemie 63, 283 (1909).

Der so erhaltene Rückstand wird mit heißem Wasser digeriert, filtriert, bis zu einem Volumen von etwa 5 ccm eingengt, die dunkelgelbe Lösung mit dem gleichen Volumen einer 3 prozentigen Quecksilbersulfatlösung in 10 prozentiger Schwefelsäure versetzt, wobei sich nach kurzer Zeit ein gelblich gefärbter Niederschlag ausscheidet. Dieser wird abfiltriert, ausgewaschen, das Filtrat vom Quecksilber durch Schwefelwasserstoff befreit, der Schwefelwasserstoff des nächsten Filtrates durch Luft verjagt, neutralisiert und mit 0,5 prozentiger Quecksilberazetatlösung in 20—30 prozentiger Natriumazetatlösung versetzt, der erhaltene Niederschlag nach Zersetzung mit Schwefelwasserstoff abermals mit Phosphorwolframsäure behandelt und diese Fällungen mit Quecksilberazetat und Phosphorwolframsäure abwechselnd so lange wiederholt, bis eine Lösung resultiert, die mit Phosphorwolframsäure und auch mit Quecksilbersulfat in Schwefelsäure nicht mehr reagiert.

Modifikation von Abderhalden und Einbeck ¹⁾.

Abderhalden und Einbeck haben die Methode von Wiechowski in der Weise modifiziert, daß sie beide von Wiechowski angegebenen Verfahren für Tierharn und Menschenharn in eine kombinierten.

Die Tagesmenge des Harnes wurde auf 500 ccm aufgefüllt und davon 200 ccm auf dem Wasserbade bei schwach saurer Reaktion bis zum dünnflüssigen Sirup eingengt. Dieser Sirup wird mit Magnesiumoxyd und mit viel Alkohol zu einem dünnen Brei verrieben, abgenutscht, der Rückstand 4—5 mal mit Alkohol ausgewaschen, das Filtrat auf dem Wasserbade fast bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit Wasser digeriert. Die Lösung wird in einem Meßkolben von 250 ccm Inhalt mit 10 ccm einer 8 prozentigen Schwefelsäure und so viel von einer 10 prozentigen Phosphorwolframsäurelösung versetzt, daß kein Niederschlag mehr entsteht, und zur Marke aufgefüllt. In 200 ccm der filtrierten Lösung wird die Allantoinbestimmung nach Wiechowski vorgenommen.

9. Hippursäure $C_9H_9NO_3$.



Eigenschaften. Die Hippursäure bildet milchweiße, lange vierseitige rhomische Prismen oder Säulen, bei rascher Kristallisation Nadeln, die bei 187° C schmelzen. Sie löst sich schwer in kaltem, leicht in heißem Wasser, sehr leicht in Alkohol und Essigäther, schwerer in Äther, ist unlöslich in Benzol und Petroläther. Über den Schmelzpunkt erhitzt, zersetzt sich die Hippursäure unter Bildung einer rötlichen Masse, gibt ein Sublimat von Benzoesäure und entwickelt anfangs einen angenehmen Neugeruch und später einen Geruch nach Blausäure.

Nachweis. Dampft man Hippursäure zur Trockne ein und erhitzt den mit Sand verriebenen Rückstand in einem Porzellanschälchen oder Glasröhrchen, so tritt ein intensiver Geruch nach Bittermandelöl durch das entstandene Nitrobenzol auf (Lücke). Diese Reaktion zeigt auch die Benzoesäure, von der

¹⁾ E. Abderhalden und H. Einbeck, Studien über den Abbau des Histidins im Organismus des Hundes. Zeitschr. f. physiol. Chemie 62, 322 (1909).

aber die Hippursäure sich durch ihre Kristallform und Unlöslichkeit in Petroläther unterscheidet.

Quantitative Bestimmung. Das Verfahren von Bunge¹⁾ und Schmiedeberg besteht darin, daß der zu untersuchende Harn mit kohlensaurem Natrium schwach alkalisch gemacht, dann bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit absolutem Alkohol erschöpft wird. Der Alkohol wird verjagt, der Rückstand in Wasser gelöst, mit Schwefelsäure angesäuert und mit Essigäther 5 mal mit neuen Portionen ausgeschüttelt. Der abgelassene Essigäther wird in einem Scheidetrichter mit Wasser wiederholt ausgewaschen, bei mäßiger Temperatur bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit Petroleumäther erschöpft, wobei Benzoessäure, Oxyssäuren, Fett und Phenole in Lösung gehen, während Hippursäure im Rückstande bleibt. Dieser wird nun in warmem Wasser gelöst und bei 50—60 ° C bis zur Kristallisation verdunstet. Die ausgeschiedenen Kristalle werden auf einem getrockneten und gewogenen Filter gesammelt.

Das Verfahren von Bunge und Schmiedeberg modifizieren Jaresveld und Stokvis²⁾ in der Weise, daß sie den Essigätherückstand nach der Behandlung mit Petroleumäther $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Stunde mit 10—20 ccm starker Natronlauge kochen, erkalten lassen, mit Salzsäure ansäuern und die gebildete Benzoessäure mehrmals mit Petroleumäther ausschütteln. Nach dem Verdunsten des Petroleumäthers wird die Benzoessäure getrocknet und gewogen und die erhaltene Zahl durch Multiplikation mit 1,468 auf Hippursäure umgerechnet.

Im Pferdeharn bestimmt man die Hippursäure, indem man den Harn einige Minuten mit überschüssiger Kalkmilch kocht, warm filtriert, einengt und erkalten läßt. In der abgekühlten Flüssigkeit fällt man die Hippursäure durch einen Überschuß von Salzsäure. Die ausgeschiedenen Kristalle werden abgepreßt, in Kalkmilch aufgeköcht, um sie in Lösung zu bringen, das Filtrat stark konzentriert und die Hippursäure nochmals mit Salzsäure gefällt. Salkowski empfiehlt, den mit Kalkmilch gekochten und filtrierten Harn einzudampfen, mit Alkohol zu fällen, zu filtrieren und nach dem Verjagen des Alkohols mit überschüssiger Salzsäure zu versetzen, wobei sich die Hippursäure als kristallinischer Brei ausscheidet.

Einfach gestaltet sich die Bestimmung der Hippursäure nach der von Henriques und Sörensen³⁾ angegebenen Methode.

Man säuert 50 ccm Harn mit Salzsäure an, schüttelt sechsmal mit Essigäther aus, destilliert diesen ab, kocht den Rückstand mit konzentrierter Salzsäure etwa $1\frac{1}{2}$ Stunden, wobei die Hippursäure in

¹⁾ G. Bunge und O. Schmiedeberg, Über die Bildung der Hippursäure. Arch. f. experim. Pharm. **6**, 233 (1877). — Schmiedeberg, Über Spaltungen und Synthesen im Tierkörper. Arch. f. experim. Pharm. **14**, 379 (1881).

²⁾ G. J. Jaresveld und B. J. Stokvis, Über den Einfluß der Nierenaffektion auf die Bildung von Hippursäure. Arch. f. experim. Pharm. **10**, 269 (1879).

³⁾ V. Henriques und S. Sörensen, Über die quantitative Bestimmung der Aminosäuren. Zeitschr. f. physiol. Chemie **63**, 27 (1909).

Benzoessäure und Glykokoll gespalten wird. Die Stickstoffmenge des Glykokolls wird nach Neutralisation durch Formoltitrierung bestimmt.

Nach Völker¹⁾ verfährt man in der Weise, daß man 200—300 ccm Harn in einem Schälchen bis zu $\frac{1}{3}$ eindampft, 4 g Natriumphosphat hinzufügt und weiter bis zur Sirupkonsistenz eindampft und nach Vermischen mit gebranntem Gips so lange erwärmt, bis die Masse pulverig geworden ist. Das so erhaltene Pulver wird samt der zerschlagenen und zerkleinerten Schale im Soxhletapparat zuerst 4—6 Stunden mit Petroleumäther, dann 6—10 Stunden mit reinem Äther extrahiert. Nach dem Verdunsten des Äthers wird der Rückstand in Wasser gelöst, auf dem Wasserbade bei 50—60 ° C bis auf 1—2 ccm eingedampft und der Kristallisation überlassen. Die auf einem bei 110 ° C getrockneten und gewogenen Filter gesammelten Kristalle wäscht man mit etwas Wasser und dann mit Äther aus, trocknet und wägt. Für je 1 ccm Filtrat wird 0,0015 g Hippursäure als Korrektur in Rechnung gesetzt.

Nach dem von Pfeiffer, Bloch und Riecke²⁾ angegebenen Verfahren führt man die Bestimmung der Hippursäure in folgender Weise aus. Der etwa 700 ccm fassende Destillationskolben wird durch einen Kugelaufsatz mit dem Kühler verbunden, der am unteren Ende zur Vermeidung eines etwaigen Verspritzens der oft stoßweise überdestillierenden festen Benzoessäure mit einem gebogenen Glasstutzen versehen ist; letzterer ragt während der Destillation in einen graduierten, 500 ccm fassenden Zylinder. In den Destillationskolben ragt ferner eine Hahnpipette, die bei 30 ccm eine Marke trägt. Die Destillation erfolgt aus einem Roschen Metallbade. Von dem zur Untersuchung dienenden Harn wird ein aliquoter Teil, der nicht wesentlich mehr als 1 g Hippursäure enthält, abgemessen und nach Zusatz von 45 ccm konzentrierter Schwefelsäure und einiger Siedesteinchen der Destillation unterworfen. Von diesem Flüssigkeitsgemisch wird zunächst ohne Ersatz des verdampfenden Wassers stets so viel abdestilliert, daß im Kolben 95 ccm zurückbleiben, also bei 100 ccm = 50 ccm, bei 200 ccm Harn = 150 ccm usw. Nun hat das Säuregemisch die zur leichten Verflüchtigung der Benzoessäure erforderliche Konzentration erreicht, und man läßt dann Zug um Zug je 30 ccm Wasser durch die Hahnpipette zu und destilliert gleiche Mengen Flüssigkeit ab; diese Operation wird zehnmal wiederholt. Man erhält also bei Anwendung von 100 ccm Harn im ganzen 35 ccm Destillat, bei 150 ccm Harn 400 ccm Destillat usw. Der Destillationskolben wird gegen einen anderen, mit Alkohol beschickten ausgetauscht und man destilliert zur Reinigung des Destillationsrohres 60—70 ccm Alkohol über. Nach halbstündigem Durchleiten eines Wasserstoffstromes wird das Destillat unter Verwendung von Phenolphthalein neutralisiert, so weit wie nötig eingedampft und in ein gekröpftes, bis zur Marke 50 ccm, im ganzen etwa 80 ccm fassendes Maßkölbchen übergespült. Die rot gefärbte Flüssigkeit wird mit sehr verdünnter Salzsäure neutralisiert und zum Verjagen der Kohlensäure auf dem Wasserbade erwärmt; tritt hierbei wieder Rotfärbung ein, so setzt man wieder etwas Salzsäure zu, bis bleibende Entfärbung eintritt. Nach dem Erkalten füllt man zur Marke auf und setzt aus einer in einem Stativ befestigten, mit zwei Marken und einem Zuflußrohre versehenen Pipette 10 ccm resp. bei größerer Menge Hippursäure 20 ccm einer titrierten Schwefelsäure, von der 10 ccm 1,5—2,0 g Hippursäure entsprechen, und läßt das Kölbchen 48 Stunden im Eisschranke stehen. Hierauf filtriert man durch ein trockenes Filter, liest die im Eisschrank herrschende Temperatur ab und titriert einen aliquoten Teil des Filtrates, nachdem dieses die Zimmertemperatur angenommen hat.

Die Berechnung geschieht in folgender Weise:

Angewandte Harnmenge = 100 ccm. Eingedampftes Destillat = 50 ccm,

¹⁾ Völker, *Malys Jahresber.* 1887, 215.

²⁾ Th. Pfeiffer, C. Bloch und R. Riecke, Eine neue Methode zur Bestimmung der Hippursäure. *Mitteilungen der Landwirtschaftlichen Institute der Universität Breslau* 2, 273 (1904).

versetzt mit 10 ccm titrierter Schwefelsäure, die 47,04 ccm Titrierlauge entsprechen. 1 ccm Titrierlauge entspricht 0,0410 g Hippursäure. Temperatur im Eisschrank 8,5° C. Vom Filtrate 40 ccm abgemessen und titriert; verbraucht bei zwei Bestimmungen 18,05 und 18,13, im Mittel 18,09 ccm Titrierlauge. Da in vorliegenden Falle nur $\frac{2}{3}$ der Gesamtflüssigkeit ($^{40}_{60}$) titriert wurden, so muß zu der verbrauchten Anzahl Kubikmeter Lauge die Hälfte (9,04 ccm) hinzugezählt und die Summe (27,13 ccm) von 47,04 ccm (der Vorlage) abgezogen werden. Die Differenz von 19,91 ccm Titrierlauge entspricht der ausgeschiedenen Menge Benzoesäure und ist auf diese durch Multiplikation mit dem Faktor 0,0410 umzurechnen = 0,8163 g Hippursäure. Nach der Tabelle bleibt in 60 ccm Flüssigkeit bei 8,5° eine 0,1806 g Hippursäure entsprechende Menge Benzoesäure gelöst, so daß sich in Summa ein Gehalt von $0,8163 + 0,1806 = 0,9969$ g Hippursäure in 100 ccm Harn ergibt.

Lösungskoeffizienten der Benzoesäure, berechnet auf Hippursäure.

Temperatur ° C	In 100 Teilen Wasser sind gelöst		In 60 ccm Flüssigkeit = Hippursäure g
	Benzoesäure Teile	umgerechnet auf Hippursäure Teile	
4,5	1,823	2,674	0,1604
5,0	1,850	2,714	0,1628
5,5	1,878	2,755	0,1653
6,0	1,906	2,796	0,1677
6,5	1,934	2,837	0,1702
7,0	1,963	2,880	0,1728
7,5	1,993	2,924	0,1754
8,0	2,022	2,966	0,1779
8,5	2,052	3,010	0,1806
9,0	2,083	3,056	0,1834
9,5	2,114	3,101	0,1861
10,0	2,146	3,148	0,1889
10,5	2,178	3,195	0,1917
11,0	2,211	3,244	0,1946
11,5	2,244	3,292	0,1975
12,0	2,287	3,342	0,2005
12,5	2,312	3,392	0,2035
13,0	2,346	3,442	0,2065
13,5	2,381	3,493	0,2096
14,0	2,417	3,546	0,2128
14,5	2,453	3,599	0,2159
15,0	2,420	3,653	0,2192
15,5	2,527	3,707	0,2224
16,0	2,565	3,763	0,2258
16,5	2,604	3,820	0,2292

Zur Bestimmung der Hippursäure im Harn empfiehlt Dakin ¹⁾ folgendes Verfahren. Man dampft 300—500 ccm Harn auf dem Wasserbade auf ca. 100 ccm ein, säuert stark mit Phosphorsäure an und extrahiert etwa 12 Stunden mit Essigester im Extraktionsapparat. Der Essigesterextrakt wird zur Entfernung eines Teiles des Harnstoffs viermal mit konzentrierter Kochsalzlösung ausgeschüttelt, mit Wasser

¹⁾ H. D. Dakin, Das Schicksal von Natriumbenzoat im menschlichen Organismus. Journ. of Biol. Chem. 7, 103 (1908). Chem. Centralbl. 1908, I.

gewaschen und mit Wasserdampf destilliert. Hierauf kocht man den wässerigen Rückstand mit Tierkohle, filtriert und läßt erkalten, wobei ein großer Teil der anwesenden Hippursäure auskristallisiert; man filtriert von den Kristallen ab, entfernt die Indolessigsäure und andere Verbindungen durch Ausschütteln mit einem Gemisch von Benzol und Äther, dampft die wässrige Lösung zur Trockne ein, vereinigt den Rückstand mit den vorher ausgeschiedenen Kristallen und wägt.

10. Benzoesäure $C_7H_6O_2$.



Eigenschaften. Benzoesäure bildet farblose Nadeln, Schuppen oder Blättchen, die bei 121—122° C schmelzen, bei 249° C unzersetzt sieden und bei etwa 100° C sublimieren. Sie löst sich schwer in kaltem, leichter in heißem (etwa 10 Teilen) Wasser, leicht in Alkohol, Äther, Chloroform, Benzol und Essigester, sehr schwer in Petroläther.

Beim Glühen von Benzoesäure mit Kalziumoxyd entweicht Benzol. Beim trocknen Erhitzen von benzoesaurem und ameisensaurem Kalk tritt der Geruch nach Bittermandelöl auf. Dampft man Benzoesäure mit gewöhnlicher Salpetersäure ein und erhitzt den Rückstand, so entweichen die charakteristisch riechenden Dämpfe von Nitrobenzol.

Die Salze der Alkalien und Erdalkalien sind in Wasser löslich, die der schweren Metalle schwer oder gar nicht; das Eisensalz verwandelt sich im Sonnenlicht in Salizylsäure.

Quantitative Bestimmung. Nach Lehmann wird der alkalisch gemachte Harn fast zur Trockne eingedampft, mit Alkohol ausgezogen, der Alkohol aber abdestilliert, der Rückstand in Wasser gelöst, die Lösung angesäuert und mit Petroläther ausgezogen. Der Petroläther wird verdunstet oder mit einem Luftstrom, der durch eine bis über die Flüssigkeit reichende Glasröhre geleitet wird, weggeblasen, wobei die Glasröhre weder mit Gummi- noch mit Korkstopfen befestigt werden darf. Ist die so erhaltene Benzoesäure nicht rein weiß, so löst man sie in Wasser, versetzt mit 2—3 ccm sirupöser Phosphorsäure und destilliert mit Wasserdampf am absteigenden Kühler ab, bis etwa 800 ccm Flüssigkeit übergegangen sind. Die wässrige Lösung liefert nun beim Ausschütteln mit Äther die Benzoesäure in vollständig reinem Zustande.

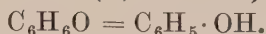
Zur Bestimmung der im Harn vorhandenen Gesamtmenge an freier und gepaarter Benzoesäure kann die von Pfeiffer, Bloch und Riecke angegebene Methode angewendet werden (s. bei Hippursäure).

11. Phenole.

Wie im normalen Stoffwechsel so auch bei künstlicher Phenolzufuhr finden wir im frischen Harn Phenol nicht in freiem Zustande, sondern stets gebunden, und zwar in Form von Ätherschwefelsäuren, die oft von kleinen Mengen Phenolglukuronsäure begleitet sind. Außer dem eigentlichen Phenol kommen im Harn, ebenfalls in gebundener Form, die drei isomeren Kresole vor, wobei die Kresolmenge z. B. im Pflanzenfresserharn die Menge des eigentlichen Phenols meistens überwiegt. Die Angaben über den Gehalt des Harnes an Phenolen beziehen sich auf das Gemisch von Phenol und Kresol. Die wich-

tigsten der Ätherschwefelsäuren sind Phenol- und Kresolschwefelsäure, Indoxyl- und Skotoxylschwefelsäure. Zu dieser Gruppe gehören auch: Brenzkatechinschwefelsäure und Hydrochinon-schwefelsäure.

Phenol (Karbolsäure).



Eigenschaften. Phenol kristallisiert in großen rhombischen Nadeln, die bei 42,5—43° C schmelzen und bei 180—180,5° C unter normalem Druck sieden. Es löst sich in kaltem Wasser, in 15 T. bei 16—17° C, in jedem Verhältnis in Alkohol, Äther, Chloroform, Benzol und Essigester. An der Luft färbt es sich nach einiger Zeit infolge einer Oxydation zu Chinon und Phenochinon schwach rot.

Versetzt man die Probe, die nicht alkalisch reagieren darf, mit einigen Tropfen des Millonschen Reagens und erhitzt, so tritt Rotfärbung, bei höherem Phenolgehalt ein roter Niederschlag auf.

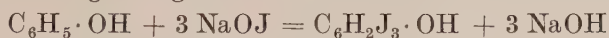
Bei Zusatz von Bromwasser bis zur Gelbfärbung entsteht ein gelblichweißer kristallinischer Niederschlag von Tribromphenol.

Mischt man die Probe mit Furfurol und unterschichtet vorsichtig mit konzentrierter Schwefelsäure, so färbt sich die Mischung zuerst kirschrot, dann blau.

Nachweis. Da das Phenol im Harn als Schwefelsäureester oder gepaarte Glukuronsäure vorhanden ist, so muß es für den Nachweis zuerst in Freiheit gesetzt werden, was durch Behandlung des Harnes mit Säure geschieht.

Man versetzt mindestens 200 ccm Harn mit etwa 50 ccm rauchender roher Salzsäure oder konzentrierter Schwefelsäure oder Phosphorsäure und destilliert, bis etwa die Hälfte übergegangen ist, oder bis das Destillat auf Zusatz von Bromwasser keine Trübung mehr gibt. Das Destillat wird nun mit Alkali stark übersättigt und nochmals destilliert, um die darin enthaltenen flüchtigen Säuren, Indol, Skatol usw., zu entfernen, die rückständige Flüssigkeit sättigt man nach dem Erkalten mit Kohlensäure, um das Phenol aus seinen Natriumverbindungen frei zu machen, und destilliert abermals. Das Destillat prüft man mit den oben angegebenen Reaktionen.

Quantitative Bestimmung. Das Prinzip der von Koßler-Penny-Neuberg angegebenen Methode besteht darin, daß das Phenol durch Hypojodid in Trijodphenol, das Kresol in Trijodkresol nach folgender Gleichung übergeführt:



und titrimetrisch (jodometrisch) bestimmt wird.

Methode von Koßler-Penny-Neuberg ¹⁾.

Man konzentriert 500 ccm des gut durchgeschüttelten Harnes auf dem Wasserbade bis auf etwa 100 ccm, die man in einen Liter-Rundkolben bringt, mit 10 g = 11 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt, mit Wasser auf etwa 400 ccm verdünnt, einige Siedesteinchen hinzufügt und destilliert, bis die Hälfte übergegangen ist, läßt aus einem Tropftrichter 200 ccm Wasser nachfließen und destilliert nochmals auf die Hälfte ab. Diese Manipulation wiederholt man 5—6 mal. Das letzte Destillat versetzt man nun mit Magnesiumkarbonat bis zum Ver-

¹⁾ A. Koßler und E. Penny, Über die maßanalytische Bestimmung im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie 17, 117 (1892). — C. Neuberg, Über die quantitative Bestimmung des Phenols im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie 27, 123 (1899).

schwinden der sauren Reaktion und destilliert unter zweimaligem Ersatz der überdestillierten Flüssigkeit durch Nachfüllen von Wasser in demselben Apparat. Auf solche Weise bindet man die von den Formiaten und Nitriten des Harnes stammenden Ameisensäure und salpetrige Säure, die sonst die Jodtitration teils durch Jodabspaltung, teils infolge Verbrauch von Jod stören würden.

Um die durch die Bildung von aldehyd- und ketonartigen Produkten aus den im Harn enthaltenen Kohlehydraten bei der Destillation mit Mineralsäure, sowie durch die Glukuronsäureverbindungen bedingten Fehler zu vermeiden, empfiehlt es sich, das letzte Destillat in folgender Weise zu behandeln.

Das Destillat vom Magnesiumkarbonat wird mit 3 g reinem, salpetersäurefreiem Bleihydroxyd und 5 ccm Bleiessig oder mit 1 g Ätznatron und 6 g festem Bleiazetat versetzt, mehrfach kräftig umgeschüttelt und etwa 15 Minuten auf einem lebhaft siedenden Wasserbade erhitzt. Um die dabei entstehenden flüchtigen Karbonylverbindungen vollständig zu verjagen, destilliert man den Kolbeninhalt, bis das Destillat ammoniakalkalische Silberlösung nicht mehr reduziert. Hierauf säuert man den Kolbeninhalt stark mit verdünnter Schwefelsäure an und treibt das in den basischen Bleiphenolaten enthaltene Phenol am Kühler unter zweimaligem Ersatz der Flüssigkeitsmenge durch Wasser über.

Nun bringt man das ganze Destillat oder nur einen aliquoten Teil in eine gut schließende Stöpselflasche, versetzt mit $\frac{1}{10}$ -Normalnatronlauge (für die Gesamtmenge genügen 25—30 ccm) bis zur stark alkalischen Reaktion, stellt die Flasche in ein Wasserbad, dessen Temperatur man bis auf 90°C steigert, so daß die Temperatur des Inhaltes mindestens 60°C ist. Hierauf öffnet man die Flasche, fügt rasch 15 ccm mehr $\frac{1}{10}$ -Normaljodlösung hinzu, als $\frac{1}{10}$ -Normalnatronlauge verbraucht wurde, schließt dicht, schüttelt kräftig durch und läßt erkalten. Man säuert dann das Gemisch, das noch deutlich braun sein muß, in der Kälte mit verdünnter Schwefelsäure an und titriert das nicht verbrauchte Jod mit $\frac{1}{10}$ -Normalthiosulfat mit Stärkelösung als Indikator zurück. 1 ccm $\frac{1}{10}$ -Normaljodlösung entspricht 0,001567 g Phenol oder 0,0018018 g Kresol.

Methode von Koppeschaar¹⁾.

a) Maßanalytische Bestimmung mittels Bromwasser.

Erforderliche Reagenzien:

1. Eine Natriumthiosulfatlösung in Volumstärke gleich einer Lösung von 5 g Jod im Liter.
2. Eine Stärkelösung.
3. Bromwasser von solcher Konzentration, daß 50 ccm nach Umsetzung mit Jodkalium 18—20 ccm der Thiosulfatlösung verbrauchen. Das Bromwasser wird in Flaschen mit eingeschliffenen Stopfen von mindestens 500 bis 600 ccm Inhalt aufbewahrt.
4. Eine Lösung von Jodkalium, die im Liter 125 g enthält.

Man bringt 25 ccm der etwa 0,4 Proz. Phenol enthaltenden Lösung in einen 500 ccm fassenden Meßkolben mit eingeschliffenem Glas-

¹⁾ W. F. Koppeschaar, Zeitschr. f. analyt. Chemie 15, 233 (1876).

stöpsel, füllt rasch mit Bromwasser bis zur Marke auf und schüttelt gut durch. Nach etwa 15 Minuten gießt man den Inhalt des Kolbens in ein mit 10 ccm der Jodkaliumlösung beschicktes Becherglas, spült zweimal mit Wasser nach und titriert dann das ausgeschiedene Jod mit der Thiosulfatlösung unter Stärkezusatz. Vor der Analyse bestimmt man gewöhnlich den Gehalt des Bromwassers in der Weise, daß man 5 ccm Jodkaliumlösung mit 50 ccm Bromwasser versetzt und das ausgeschiedene Jod titriert.

b) Maßanalytische Bestimmung mittels Natriumbromid und Natriumbromat.

Erforderliche Lösungen:

1. Eine Lösung von $5 \text{ NaBr}_2 + \text{NaBrO}_3$ ¹⁾ von solcher Stärke, daß 50 ccm nach Mischung mit 10 ccm der Jodkaliumlösung und nach Zugabe von 5 ccm konzentrierter Salzsäure, sowie Verdünnung mit etwa 1000 ccm Wasser 86 bis 95 ccm der Thiosulfatlösung erfordern.

2. Die übrigen Lösungen werden wie unter a hergestellt.

Man bringt 25 ccm der Phenollösung in eine 250 ccm fassende Flasche mit eingeschliffenem Stopfen, fügt 100 ccm der Bromid-Bromatlösung und 5 ccm konzentrierte Salzsäure hinzu, verschließt, schüttelt gut durch und läßt 15 Minuten stehen. Hierauf versetzt man mit 10 ccm Kaliumjodidlösung, schließt die Flasche, schüttelt gut durch und titriert dann das ausgeschiedene Jod mit Natriumthiosulfatlösung unter Benutzung der Stärkelösung als Indikator.

Methode von Autenrieth und Beuttel ²⁾.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß Phenol durch einen bedeutenden Überschuß von Bromwasser in wässriger Lösung als Tetrabromphenol, das sogenannte Tribromphenolbrom, nach der Gleichung: $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{OH} + 8 \text{ Br} = 4 \text{ HBr} + \text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_4\text{O}_3$ genommen wird.

Man versetzt die wässrige Phenollösung mit so viel gesättigtem Bromwasser, daß die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit rotbraun gefärbt erscheint und über letzterer reichlich Bromdämpfe bemerkbar werden, schüttelt 10—15 Minuten gut durch, läßt das Gemisch bis zum nächsten Tage auf Eis stehen, filtriert den ausgeschiedenen Niederschlag ab und trocknet ihn im Vakuum über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz.

12. Kresole $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}$.



Eigenschaften. o-Kresol. Die Kristalle des o-Kresols schmelzen bei 30° C und sieden bei 191° C . Es ist in verdünntem Ammoniak unlöslich (Unterschied von Phenol), beim Schmelzen mit Ätzkali liefert es Salizylsäure (o-Oxybenzoesäure), mit Pikrinsäure bildet es orangefarbene Nadeln vom Schmelzpunkt 88° C , mit Eisenchlorid färben sich die Lösungen blau.

¹⁾ Das Salzgemisch bereitet man durch Umsetzung einer reinen Ätznatronlauge mit einem Überschuß von Brom ($6 \text{ NaOH} + 6 \text{ Br} = 5 \text{ NaBr} + \text{NaBrO}_3 + 3 \text{ H}_2\text{O}$), Abdampfen zur Trockne und Zerreiben des festen Rückstandes, falls man denselben nicht auf einmal in Lösung bringt. Löst man davon 9 g in 100 ccm Wasser, so erhält man eine zu starke Lösung, die durch Zusatz von Wasser leicht auf die richtige Stärke gebracht werden kann.

²⁾ W. Autenrieth und Fr. Beuttel, Arch. d. Pharmazie **248**, 112 (1910).

m-Kresol stellt eine farblose Flüssigkeit dar, die bei 202,8° C siedet. Mit Kalischmelze liefert es m-Oxybenzoesäure, mit Pikrinsäure liefert es kein festes Pikrat, durch Eisenchlorid färbt sich die wässrige Lösung violett.

p-Kresol kristallisiert in Prismen, die bei 36° C schmelzen und bei 201,8° C siedet. Seine wässrige Lösung färbt sich auf Zusatz von Eisenchlorid blau, beim Schmelzen mit Kalihydrat gibt es p-Oxybenzoesäure, mit überschüssigem Bromwasser liefert es Tribromkresolbrom, mit Pikrinsäure bildet es kein schwer lösliches Pikrat.

Nachweis. Man löst die Kalischmelze des Phenolgemisches in Wasser, fügt Schwefelsäure bis zur sauren Reaktion hinzu, schüttelt gut mit Äther aus. Der Äther wird verjagt und der Rückstand mit Chloroform ausgezogen, wobei die gebildete Salizylsäure in Lösung geht. Die Salizylsäure läßt sich durch Versetzen der durch Destillation von Phenol befreiten wässrigen Lösung mit Eisenchlorid, wobei Violettfärbung auftritt, bestimmen. (Hoppe-Seyler-Thierfelder.)

Nach C. Preuß¹⁾ schmilzt man das Kresolgemisch mit festem Ätzkali, wobei das eventuell vorhandene Phenol unverändert bleibt, während die drei Kresole ohne Umlagerung in die entsprechenden drei Oxybenzoesäuren übergehen. Die Schmelze löst man nun in Wasser, filtriert, säuert mit Schwefelsäure an, versetzt dann die Lösung mit Natriumkarbonat bis zur alkalischen Reaktion und schüttelt mit Äther aus, in den die unveränderten Kresole und das Phenol übergehen. Die alkalische wässrige Lösung wird etwas eingengt, mit Schwefelsäure oder Phosphorsäure angesäuert und destilliert, wobei die flüchtige o-Oxybenzoesäure übergeht, während die m- und p-Oxybenzoesäure im Destillationsrückstande bleibt, der zwecks Isolierung der Säuren mit Äther ausgeschüttelt wird. Nach dem Verdunsten des Äthers zieht man den Rückstand mit Chloroform aus, um die etwa anhaftende Salizylsäure zu entfernen.

Baumann digeriert das Phenolgemisch mit der gleichen Menge konzentrierter Schwefelsäure 1 Stunde auf dem Wasserbade, verdünnt hierauf mit Wasser, neutralisiert genau mit Bariumhydroxyd, filtriert vom ausgeschiedenen Bariumsulfat ab, dampft bis zur beginnenden Kristallisation ein und versetzt mit gesättigtem Barytwasser. Nach 12stündigem Stehen scheidet sich basisches p-kresolsulfosaures Barium aus, während die o- und m-Verbindungen in Lösung bleiben.

Versetzt man 10 ccm einer etwa 2prozentigen wässrigen Phenol-Kresolösung der Reihe nach mit 1 Tropfen Anilin, 3—4 ccm Natronlauge, dann nach dem Schütteln mit 5—6 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd und nach erneutem Umschütteln mit 15 Tropfen Natriumhypochloridlösung, so färben sich die drei Kresole blau, das Phenol rot.

Trennung des Kresols vom Phenol und o-Kresol nach E. Baumann²⁾.

Die das Phenolgemisch enthaltende Lösung versetzt man mit überschüssigem Alkali, engt, wenn nötig, ein, säuert an und schüttelt wiederholt mit Äther aus. Der Äther wird abdestilliert, der Rückstand mit Chlorkalzium getrocknet und dann destilliert, das Destillat mit dem gleichen Gewicht konzentrierter Schwefelsäure auf dem Wasserbade eine Stunde erwärmt, mit Wasser verdünnt, mit Baryt bis zur neutralen Reaktion versetzt und filtriert. Hierauf dampft man das Filtrat nahe bis zur Kristallisation ein, versetzt mit konzentriertem Barytwasser im Überschuß, läßt 12 Stunden stehen und filtriert das ausgeschiedene basische p-kresolsulfosaure Barium ab. Der im Filtrat enthaltene Baryt wird durch Kohlensäure ausgeschieden, abfiltriert, das Filtrat auf

¹⁾ C. Preuß, Über das Vorkommen isomerer Kresolschwefelsäuren im Pferdeharn. Zeitschr. f. physiol. Chemie 2, 355 (1878).

²⁾ E. Baumann, Über die Ätherschwefelsäuren der Phenole. Zeitschr. f. physiol. Chemie 2, 336 (1878/79). — Über den Nachweis und Darstellung von Phenolen und Oxyssäuren aus dem Harn. Ibidem 6, 183 (1882).

ein kleines Volumen eingeengt, mit konzentriertem Barytwasser gefällt und 12 Stunden stehen gelassen. Nun filtriert man, leitet Kohlensäure ein, filtriert abermals, dampft zur Trockne ein und wägt und erhält so im Rückstande das phenolsulfosaure und o-kresolsulfosaure Barium. Die Niederschläge werden nun mit Wasser verrührt, mit Kohlensäure behandelt, filtriert, das Filtrat eingedampft, getrocknet und gewogen; man erfährt so die Menge des p-kresolsulfosauren Bariums.

Trennung der Harnphenole nach P. Riehm ¹⁾.

Man verrührt das Gemisch der Phenolkörper mit Wasser und einer zur Neutralisation nötigen Menge Barythydrat, wobei die Phenolkörper als Barytsalze in Lösung gehen und der Geruch nach Phenolkörpern verschwindet. (Das Barytsalz des Phenols löst sich bei 100 ° C in 40 Proz. seines Gewichtes an Wasser, das Bariumsals des o-Kresols löst sich in 150 Proz., das Salz des p-Kresols in 325 Proz. Wasser. Das in siedendem Wasser sehr leicht lösliche Salz des m-Kresols bildet beim Eindampfen eine harzige Masse, die nicht kristallisiert.) Die Lösung dampft man ein und überläßt sie der Kristallisation, wobei sich die Barytsalze des Phenols und des o- und p-Kresols ausscheiden, und das m-Kresolsalz bleibt in Lösung. Die so erhaltene Kristallmasse wird, nachdem man sie durch Umkristallisieren aus Wasser gereinigt, getrocknet und pulverisiert hat, mit so viel Wasser versetzt, als man nach dem Gewicht in dem Salzgemenge Phenolverbindung erwartet, erhitzt und siedend heiß filtriert, wobei im Filtrate die Hauptmenge Phenolbaryt enthalten ist. Den Rückstand behandelt man nun mit $\frac{1}{2}$ mal so viel kochendem Wasser, als man o-Kresol vermutet, und filtriert heiß; im Filtrat ist o-Kresolbaryt enthalten. Behandelt man jetzt den Rückstand mit $3\frac{1}{2}$ fachem Gewicht kochenden Wassers und filtriert heiß, so liefert das Filtrat p-Kresol.

13. Ätherschwefelsäuren.

Eigenschaften. Die Alkalisalze der Phenolschwefelsäure kristallisieren in weißen perlmutterglänzenden Blättchen, die in Wasser und kochendem Alkohol leicht, in kaltem Alkohol schwer löslich sind. Kocht man die Lösung der Salze mit Mineralsäure, so tritt schnell Spaltung in Phenol und Schwefelsäure ein. Sie geben kein Phenol- und keine Schwefelreaktion, gegen Alkalien sind sie selbst in der Siedehitze beständig. Die freie Phenolschwefelsäure in wässriger Lösung zersetzt sich allmählich in ihre Komponenten.

Darstellung. Die Phenolschwefelsäure wird nach Baumann in der Weise gewonnen, daß man einige Tage lang an Hunde mehrere Gramm Phenol pro Tag verfüttert, den gesammelten Harn, 8—10 Liter, zum Sirup eindampft, den man dann mit 96 prozentigem Alkohol extrahiert und filtriert. Das Filtrat versetzt man mit einer alkoholischen Oxalsäurelösung, so lange noch ein Niederschlag von Harnstoffoxalat usw. entsteht, filtriert nach 10 Minuten (ein längeres Stehen ist wegen der leichten Zersetzlichkeit der freien Phenolschwefelsäure nicht zu empfehlen), versetzt mit alkoholischer Kalilauge bis zur alkalischen

¹⁾ C. Neuberg, Der Harn sowie die übrigen Ausscheidungen des Körpers.

Reaktion. Hierauf filtriert man, engt das Filtrat zum Sirup ein und läßt in der Kälte stehen, wobei es zu einem kristallinen Brei von phenolschwefelsaurem Kalium erstarrt.



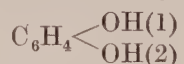
Eigenschaften. Die Alkalisalze der p-Kresolschwefelsäure kristallisieren in weißen, perlmutterglänzenden Blättchen, die in Wasser und kochendem Alkohol leicht, in kaltem Alkohol schwer löslich sind. Die Eigenschaften dieser Salze sind dieselben wie bei der Phenolschwefelsäure, nur das Kaliumsalz ist etwas schwerer löslich und leichter zersetzlich.

Darstellung. Im Gemisch mit Phenolschwefelsäure wird die p-Kresolschwefelsäure aus Pferdeharn, dessen konstanter Bestandteil sie ist, dargestellt, indem man 50—100 Liter Pferdeharn zum Sirup einengt und mit 90 prozentigem Alkohol extrahiert. Der alkoholische Auszug wird nun zum dünnen Sirup konzentriert und mehrere Tage bei niedriger Temperatur stehen gelassen, wobei das Gemisch zu einem Kristallbrei erstarrt, der mehrmals aus Alkohol umkristallisiert wird.

Die p-Kresolschwefelsäure erhält man auch, wenn man Pferdeharn mit Bleiazetat und Bleisubazetat fällt, filtriert, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff behandelt und das vom ausgeschiedenen Schwefelblei befreite Filtrat der Kristallisation im Vakuum überläßt.

o- und m-Kresolschwefelsäure.

Diese sind nur in manchen Harnen enthalten.



Eigenschaften. Brenzkatechin kristallisiert aus Wasser in prismatischen Nadeln, aus Äther und Ligroin in Prismen oder Tafeln, aus Benzol in breiten Blättern, die bei 104° C schmelzen und bei 245° C unzersetzt sieden. Es ist in Wasser, Alkohol, Äther und kaltem Benzol leicht löslich. Mit Bleizucker gibt das Brenzkatechin einen weißen Niederschlag, reduziert Silbernitrat schon in der Kälte, Fehlingsche Lösung beim Erwärmen. Die wässrige Lösung färbt sich in Gegenwart von Alkalien grün, grünbraun bis schwarz. Versetzt man eine wässrige Brenzkatechinlösung mit einer Lösung von Weinsäure in ammoniakalischer verdünnter Eisenchloridlösung, so erhält man eine violette oder kirschrote Flüssigkeit, die beim Sättigen mit Essigsäure grün wird.

Nachweis. Zum Nachweis des Brenzkatechins konzentriert man zuerst den Harn, filtriert, versetzt mit Schwefelsäure und kocht zur Entfernung des Phenols, läßt erkalten und schüttelt mehrmals mit Äther aus. Der Äther sämtlicher Auszüge wird abdestilliert, der Rückstand mit Bariumkarbonat neutralisiert, dann mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Verdunsten des Äthers bleibt Brenzkatechin zurück.

Darstellung. Nach Baumann verfährt man bei der Isolierung des Brenzkatechins aus dem Harn in der Weise, daß man diesen mit Salzsäure stark ansäuert, auf dem kochenden Wasserbade etwa ½ Stunde digeriert und mehrmals mit Äther auszieht. Die vereinigten Ätherauszüge werden zur Entfernung der Säuren mehrmals mit verdünnter Soda-lösung ausgeschüttelt, der Äther abdestilliert, der Rückstand mit gesättigter Kochsalz- oder Natriumsulfatlösung versetzt, wobei die Haupt-

menge von Phenol und Kresol ausgeschieden wird. Den Rest des Phenols und Kresols entfernt man in der Weise, daß man das mit Wasser verdünnte Filtrat der Destillation unterwirft. Hierauf schüttelt man mit Äther aus, läßt den Äther der vereinigten Ausszüge verdunsten und erhält auf solche Weise im Rückstande einen Sirup, der aus Brenzkatechin und Hydrochinon besteht, dieser erstarrt aber kristallinisch bei einem höheren Gehalt an Hydrochinon. Der so erhaltene Rückstand wird in Wasser gelöst und mit Bleiazetat (unter Vermeidung eines Überschusses) gefällt, wodurch sich Brenzkatechin ausscheidet, während Hydrochinon in Lösung bleibt. Hierauf verteilt man den Niederschlag in Wasser, versetzt mit Schwefelsäure und schüttelt mit Äther aus; beim Verdunsten des Ätherauszuges bleibt Brenzkatechin zurück.

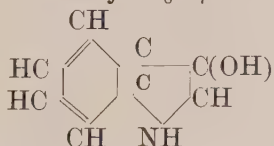
Hydrochinon $C_6H_4(OH)_2$.

Eigenschaften. Das Hydrochinon bildet rhombische Kristalle, die bei $169^\circ C$ schmelzen. Es löst sehr leicht in heißem Wasser, Alkohol und Äther, schwer in kaltem Benzol (Unterschied von Brenzkatechin) und Toluol. Beim Erhitzen von Hydrochinon im offenen Reagenzglas färbt sich das Sublimat indigblau. Durch Oxydationsmittel, wie Eisenchlorid, Chlor, Salpetersäure, Chromsäure usw. wird es in Chinon verwandelt, dessen charakteristischer starker Geruch sich leicht erkennen läßt. Durch Fehlingsche Lösung wird es schon in der Kälte, durch Silbernitratlösung erst beim Erwärmen reduziert. Normales Bleiazetat fällt das Hydrochinon nicht (Unterschied von Brenzkatechin).

Isolierung. Man destilliert den mit Salzsäure oder Schwefelsäure angesäuerten Harn etwa $\frac{3}{4}$ Stunden, um die flüchtigen Phenole und Fettsäuren zu verjagen, zieht den Rückstand zuerst mit Äther und dann mit Essigester aus, dampft die vereinigten Ausszüge ein und löst den Rückstand in Wasser. Diese Lösung wird nun mit Bariumkarbonat gekocht, filtriert, das Filtrat mit Äther ausgeschüttelt und der Ätherauszug verdunstet, wobei Hydrochinon und eventuell Brenzkatechin als Rückstand bleibt. Das Brenzkatechin, dessen Gegenwart durch die Grünfärbung mit verdünnter Eisenchloridlösung nachgewiesen werden kann, wird durch Fällung der konzentrierten wässerigen Lösung mit der nötigen Menge Bleiazetat entfernt. Das Filtrat des Bleiniederschlages wird mit verdünnter Schwefelsäure gefällt, filtriert, dann mit Bariumkarbonat erwärmt, abermals filtriert, mit Äther ausgeschüttelt, dieser verdunstet und der Rückstand aus heißem Toluol umkristallisiert.

Über das von E. Baumann angegebene Verfahren s. unter Brenzkatechin.

Indoxyl C_8H_7NO .



Eigenschaften. Das Indoxyl kommt in dem Harn als Indoxylschwefelsäure und Indoxylglukuronsäure vor. Es bildet hellgelbe Kristalle, die bei $85^\circ C$ schmelzen, sich in Wasser mit grüner Fluoreszenz lösen, in Alkohol, Äther

und Azeton leicht löslich sind. Durch Behandlung von Indoxyl in Kalilauge, gelöst mit pyroschwefelsaurem Kali, entsteht Indoxylschwefelsäure. In alkalischer und ammoniakalischer Lösung, sowie auf Zusatz von Salzsäure und Eisenchlorid oxydiert es sich zu Indigblau.

Indoxylschwefelsäure (Harnindikan) $C_8H_7NSO_4$.

Eigenschaften. Die Indoxylschwefelsäure kommt in dem Harn als Kaliumsalz vor, das in farblosen, glänzenden Tafeln oder Blättchen kristallisiert, die in Wasser leicht, in Alkohol weniger leicht löslich sind.

Nachweis. Man versetzt 10 ccm eiweißfreien Harn mit dem gleichen Volumen konzentrierter Salzsäure, 1—2 Tropfen kaltgesättigter Chlorkalklösung, schüttelt um, fügt 2—3 ccm Chloroform hinzu, verschließt das Reagenzglas mit dem Daumen und dreht es öfter um, ohne zu schütteln, wobei sich das Chloroform durch das gebildete Indigo intensiv blau färbt. Diese Lösung zeigt einen scharfen Absorptionsstreifen zwischen C und D (Jaffé)¹⁾.

Die Methode von Jaffé hat den Nachteil, daß die Menge Chlorkalk, die zur Überführung des Indoxyls in Indigo erforderlich, nur durch Ausprobieren gefunden werden kann. Bei ungenügender Chlorkalkmenge ist die Bildung des Indigos unvollständig; bei einem Überschuß wird das Indigo oxydiert.

Obermayers Indikanprobe²⁾. 20 ccm des sauer reagierenden Harns werden mit 2 ccm Bleiessig gefällt, das Filtrat mit dem gleichen Volumen reiner konzentrierter Salzsäure (1,19), die 0,2—0,4 Proz. Eisenchlorid enthält, und 3 ccm Chloroform versetzt und dann stark durchgeschüttelt. Die Chloroformschicht färbt sich, je nach dem Gehalt an Indikan, schwächer oder stärker blau. Bei Gegenwart von Jodiden fügt man nachträglich etwas Natriumthiosulfat in Wasser gelöst oder Natronlauge hinzu.

Nach Salkowski³⁾ verfährt man in der Weise, daß man 8 ccm Harn mit 1 ccm Kupfersulfatlösung (1 : 10) und dem gleichen Volumen Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 versetzt, dann 3—4 ccm Chloroform hinzufügt und das Ganze durch Neigen des Reagenzglases vorsichtig durchmischt; das Chloroform färbt sich dabei blau. Bei einem geringen Indikangehalt dampft man eine größere Menge Harn ein, nimmt den Rückstand mit Alkohol auf, verjagt den Alkohol, löst den Rückstand in Wasser und weist das Indikan, wie angegeben, nach.

Darstellung. Nach Baumann und Brieger⁴⁾ wird der Harn bis zur Sirupkonsistenz eingedampft, die von Salzen und auskristallisiertem Harnstoff getrennte Mutterlauge wird mit 90 prozentigem Alkohol extrahiert. Der alkoholische Auszug wird in der Kälte mit alkoholischer Oxalsäurelösung versetzt, so lange ein Niederschlag entsteht, das vom Niederschlag befreite Filtrat mit alkoholischer Kalilauge bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt, vom ausgeschiedenen oxalsauren Kali abfiltriert, bis auf etwa 2 Liter eingeeengt und mit einem gleichen Volumen Äther gefällt. Der dabei entstehende sirupöse Niederschlag enthält neben Salzen, Harnstoff, Extraktiv- und Farbstoffen den größten Teil der Indigo bildenden Substanz. Der Sirup wird wiederholt mit 96 prozentigem Alkohol ausgekocht und mit dem gleichen Volumen Äther gefällt. Durch wiederholte Fällung der alkoholischen Lösung mit Äther gelingt eine vollkommene Abtrennung des Harnstoffs, während beim Wiederauflösen dieser Niederschläge in Alkohol ein Teil der Ex-

¹⁾ Jaffé, Pflügers Archiv 3, 448 (1870).

²⁾ Obermayer, Eine Modifikation der Jafféschen Indikanprobe. Wien. klin. Wochenschr. 9, 176 (1890).

³⁾ E. Salkowski, Zum Nachweis des Indikans im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie 57, 519 (1908).

⁴⁾ E. Baumann und L. Brieger, Über Indoxylschwefelsäure, das Indikan des Harns. Zeitschr. f. physiol. Chemie 3, 254 (1879).

traktivstoffe ungelöst bleibt. Die so gereinigte alkoholische Lösung wird mit Äther so lange versetzt, bis eine bleibende Trübung entsteht, wobei sich beim Stehen an den Wänden des Gefäßes aus mikroskopischen Blättchen bestehende Kristallwarzen ausscheiden, die durch 1—2 maliges Umkristallisieren aus siedendem Alkohol in blendend weißen, glänzenden Tafeln und Blättchen kristallisieren.

Die Modifikation von Hoppe-Seyler ¹⁾ besteht im wesentlichen darin, daß er den zum dünnen Sirup eingeeengten Harn mit 96 prozentigem Alkohol ausfällt, das Filtrat mit dem gleichen Volumen Äther versetzt und 24 Stunden stehen läßt. Die abgegossene klare Flüssigkeit wird nun mit alkoholischer Oxalsäurelösung gefällt, filtriert, das Filtrat mit konzentrierter Kaliumkarbonatlösung alkalisch gemacht, zum dicken Sirup bei stets alkalischer Reaktion eingedampft, der Sirup mit der 15—20 fachen Menge kalten absoluten Alkohols aufgenommen und in einem geschlossenen Gefäß 24 Stunden stehen gelassen, wobei sich ein Niederschlag ausscheidet. Dieser wird mit 96 prozentigem Alkohol erhitzt und die Lösung der Kristallisation überlassen. Das Filtrat liefert noch weitere Kristalle des indoxylschwefelsauren Kaliums, wenn man mit Äther fällt, von den ausgeschiedenen Schmierern abgießt und in der Kälte stehen läßt.

Quantitative Bestimmung. Das Prinzip der empfohlenen Methoden zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung des Harnindikans beruht auf Spaltung der indoxylschwefelsauren Salze in Indoxyl und Schwefelsäure und Oxydation des Indoxyls zu Indigo. Die Menge des erhaltenen Indigo bestimmt man gravimetrisch, titrimetrisch, kolorimetrisch und spektrophotometrisch.

Methode nach Obermayer, Wang ²⁾.

Das Prinzip beider Autoren ist das gleiche:

Der Harn wird mit 20 prozentiger Bleizuckerlösung gefällt, das klare Filtrat, 200 ccm, mit dem gleichen Volumen von Obermayers Reagens (rauchende Salzsäure, die im Liter 2—4 g festes Eisenchlorid enthält) im Scheidetrichter versetzt, das gebildete Indigo mit Chloroform extrahiert und in einem Kolben gesammelt. Das Chloroform wird abdestilliert und der Rückstand nach Erkalten mit einer Mischung von gleichen Raumteilen Äther, Alkohol und Wasser ausgewaschen. Die in der Waschflüssigkeit aufgeschwemmten Indigoteilchen werden auf einem kleinen Filter gesammelt und getrocknet. Das Filter mit Inhalt wird mit Chloroform ausgekocht, bis sich alles Indigo gelöst hat, und die Lösung in den Kolben hineinfiltriert. Nach dem Abdestillieren des Chloroforms versetzt man mit konzentrierter Schwefelsäure, läßt einige Stunden stehen, verdünnt mit Wasser und titriert mit Kaliumperman-

¹⁾ Hoppe-Seyler, Beiträge zur Kenntnis der Indigo bildenden Substanzen im Harn. *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **7**, 423 (1882/83).

²⁾ Eu. Wang, Über die quantitative Bestimmung des Harnindikans. *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **25**, 406 (1898). Weiteres über quantitative Bestimmung des Harnindikans. *Ibidem* **27**, 135 (1899).

ganatlösung. Die Lösung enthält etwa 3 g KMnO_4 im Liter, davon werden 5 ccm auf 200 ccm verdünnt. 1 ccm verdünnter Kaliumpermanganatlösung entspricht 0,177 mg Indigo.

Modifikation nach Ellinger ¹⁾.

Der sauer reagierende oder mit Essigsäure schwach angesäuerte Harn wird mit $\frac{1}{10}$ Volumen Liquor plumbi subacetici gefällt; falls das spezifische Gewicht sehr hoch ist (etwa über 1040), muß der Harn vorher auf die Hälfte verdünnt werden. Je nach dem Gehalt an Indikan, den man durch eine qualitative Vorprobe schätzen kann, wird ein abgemessenes Volumen des Filtrates vom Bleiniederschlag mit dem gleichen Volumen Obermayers Reagens im Schütteltrichter versetzt und mit Chloroform mehrmals ausgeschüttelt, bis eine neue Portion Chloroform sich nicht mehr färbt. Die vereinigten Chloroformauszüge werden durch ein trockenes Filter filtriert, das Chloroform abdestilliert, der Rückstand auf dem Wasserbade im liegenden offenen Kolben etwa 5 Minuten getrocknet. Der trockene Rückstand wird mit heißem Wasser 2—3 mal ausgewaschen, bis das Waschwasser nicht mehr gefärbt ist, mit 10 ccm reiner konzentrierter Schwefelsäure aufgenommen und 5—10 Minuten auf dem kochenden Wasserbade erwärmt. Nun bringt man die Schwefelsäurelösung quantitativ in einen mit 100 ccm destilliertem Wasser beschickten Erlenmeyerkolben und versetzt ihn mit der Kaliumpermanganatlösung so lange tropfenweise, bis der rötliche Ton in reines Gelb umgeschlagen ist. Der Titer der Kaliumpermanganatlösung muß mit reinem Indigoblau gestellt werden.

Methode von Imabuchi ²⁾.

Salkowski hat zuerst auf die Anwendung von Kupfersulfat zum Nachweis des Harnindikans aufmerksam gemacht. Imabuchi zeigte, daß Kupfersulfat + Salzsäure auch für quantitative Bestimmungen mit Erfolg anwendbar ist.

Der saure oder vorher mit Essigsäure schwach angesäuerte Harn wird mit $\frac{1}{10}$ Volumen Liquor ferri subacetici gefällt und filtriert. 50 ccm des Harnfiltrates werden in einem Schütteltrichter mit 1—2 ccm einer 10 prozentigen Kupfersulfatlösung und dem gleichen Volumen konzentrierter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 und 5—10 Minuten stehen gelassen. (Bei indikanreichen Harnen verdünnt man mit destilliertem Wasser, bis auf 50 ccm Harnfiltrat weniger als 5 ccm Kaliumpermanganatlösung zur Titration erforderlich sind.) Hierauf schüttelt man das Gemisch mit Chloroform aus, und zwar zuerst mit 50 ccm und die folgenden 3 mal mit je 20 ccm, wobei jede Manipulation 2 Minuten dauern muß, bis eine neue Portion Chloroform sich nicht mehr färbt. Die vereinigten Chloroformauszüge werden durch ein trockenes Filter

¹⁾ A. Ellinger, Zur Methode der Indikanbestimmung im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie **38**, 178 (1903).

²⁾ T. Imabuchi, Über quantitative Bestimmung des Harnindikans. Zeitschr. f. physiol. Chemie **60**, 502 (1909).

in einen trockenen Kolben filtriert, das Chloroform auf dem Wasserbade abdestilliert und der Rückstand im Kolben auf dem Wasserbade 5 Minuten lang getrocknet. Der Rückstand wird nun durch Dekantieren mit heißem Wasser mehrmals gewaschen, bis das letzte Waschwasser Kaliumpermanganatlösung nicht mehr entfärbt, dann mit 10 ccm reiner konzentrierter Schwefelsäure aufgenommen, auf dem kochenden Wasserbade 5—10 Minuten erwärmt, mit 100 ccm destilliertem Wasser verdünnt und mit $\frac{1}{400}$ -Normal-Kaliumpermanganatlösung titriert. 1 ccm dieser Lösung entspricht 0,165 mg Indigo.

Methode von Bouma¹⁾.

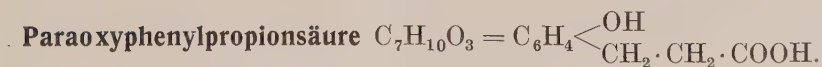
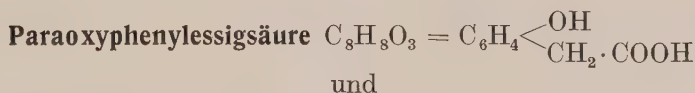
Diese Methode besteht darin, daß das Indoxyl des Harnes mit Isatinsalzsäure in Indigorot umgewandelt wird.

300 ccm Harn werden mit 100 ccm Bleiessig gefällt, filtriert, das Filtrat mit dem gleichen Volumen Isatinsalzsäure (20 mg Isatin in einem Liter konzentrierter Salzsäure) versetzt und 15 Minuten auf dem kochenden Wasserbade erhitzt, wobei sich das Gemisch dunkelrot färbt. Nach dem Erkalten schüttelt man mit Chloroform aus, läßt den Chloroformauszug einige Minuten stehen, gießt vorsichtig ab, verjagt das Chloroform und trocknet den Rückstand 2 Stunden bei 110° C. Den getrockneten Rückstand zieht man mit Wasser mehrmals aus, bis die dekantierte Flüssigkeit nicht mehr reduziert, d. h. bis der letzte Rest des Isatins entfernt ist, löst ihn in konzentrierter Schwefelsäure und titriert die so erhaltene Indigorotdisulfosäure mit Kaliumpermanganat.

Die Permanganatlösung wird mit reiner Indigorotlösung in der Weise eingestellt, daß man das käufliche Indigorot in Chloroform löst, läßt dann das Chloroform verdunsten, nimmt das Indigorot in Äther auf, läßt diesen verdunsten, löst 5—10 mg des getrockneten Rückstandes in konzentrierter Schwefelsäure und titriert mit Kaliumpermanganatlösung.

Von der bei der Bestimmung gefundenen Menge entspricht nur die Hälfte dem Harnindigo, da die andere Hälfte vom Isatin stammt.

14. Aromatische Oxysäuren.



Nachweis. Baumann²⁾ weist diese zwei Oxysäuren nach, indem er den Harn mit Salzsäure versetzt und einige Zeit auf dem Wasserbade erwärmt, um die flüchtigen Phenole zu verjagen. Nach dem Erkalten schüttelt man den Harn dreimal mit Äther aus, versetzt den Ätherauszug mit schwacher Sodalösung,

¹⁾ J. Bouma, Über die Bestimmung des Harnindikans als Indigonat mit Isatinsalzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie **32**, 82 (1901). Nachtrag zur Methodik der Indikanbestimmung im Harn. Ibidem **39**, 356 (1908).

²⁾ E. Baumann, Über den Nachweis und die Darstellung von Phenolen und Oxysäuren aus dem Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie **6**, 191 (1881).

die die Oxysäuren aufnimmt, während die Phenole im Äther gelöst bleiben. Die Oxysäurelösung säuert man mit Schwefelsäure, schüttelt mit Äther aus, löst den Rückstand nach dem Verdunsten des Äthers in Wasser und versetzt diese Lösung mit dem Milonschen Reagens, wodurch beim Erwärmen eine schön rote Farbe auftritt. Die beiden Oxysäuren lassen sich durch ihren verschiedenen Schmelzpunkt erkennen — die p-Oxyphenylelessigsäure schmilzt bei 148° C, die p-Oxyphenylpropionsäure bei 125° C.

Isolierung. Man dampft etwa 50 Liter Harn zum dünnen Sirup ein, säuert mit Essigsäure stark an, behandelt mit Äther, schüttelt die Ätherauszüge mehrmals mit einem Überschuß von Natriumkarbonatlösung, säuert die wässerigen Lösungen mit Essigsäure an und schüttelt mit Äther aus. Der Äther wird nun abdestilliert, die Essigsäure durch Erwärmen des Rückstandes auf dem Wasserbade verjagt, in Wasser gelöst, filtriert, mit Äther ausgezogen, das nach dem Abdestillieren zurückbleibende braune Öl mit Wasser mehrmals ausgezogen und die wässerigen Auszüge mit Bleiazetat bis zur vollständigen Fällung versetzt und filtriert. Im Filtrate werden die Oxysäuren mit basischem Bleiazetat gefällt, der Niederschlag abfiltriert, ausgewaschen, in Wasser verteilt, Schwefelwasserstoff eingeleitet, vom ausgeschiedenen Schwefelblei abfiltriert und das Filtrat mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Verdunsten des Äthers bleibt eine stark saure sirupöse gelbe Flüssigkeit, die nach einigen Tagen kristallinisch erstarrt. Beim Umkristallisieren der kristallinischen Masse aus Wasser scheidet sich zuerst die p-Oxyphenylelessigsäure ab, die aus Benzol rein kristallisiert, und aus der Mutterlauge erhält man p-Oxyphenylpropionsäure mit etwas p-Oxyphenylelessigsäure gemengt (Baumann¹⁾).

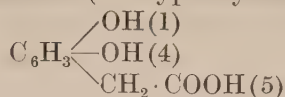
Bequemer gestaltet sich die Isolierung der aromatischen Oxysäuren nach dem Verfahren von Magnus-Levy²⁾.

Man dampft 100 Liter Harn ein, sättigt mit Ammoniumsulfat, filtriert, säuert mit Schwefelsäure genau an und unterwirft einer Extraktion mit Äther im Soxhletapparat. Der Äther wird abdestilliert, der Rückstand in Wasser gelöst und mit Bleiazetat gefällt, wodurch andere Substanzen beseitigt werden. Durch Bleiessig, zum Teil aber auch erst durch Bleiessig und Ammoniak, erhält man das Gemisch der Bleisalze der aromatischen Oxysäuren. Die Bleifällung wird abfiltriert und mit Wasser ausgewaschen, dann mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat mit Äther extrahiert, der Äther verjagt, wobei ein beide Oxysäuren enthaltendes, bald erstarrendes Öl zurückbleibt. Erstarrt es nicht, so löst man es in Wasser, kocht mit Bariumkarbonat, zerlegt die so erhaltenen Barytsalze mit Mineralsäure und extrahiert die freien Oxysäuren mit Äther. Beim Verdunsten des Äthers erstarren sie kristallinisch. Bei der Kristallisation aus heißem Wasser fällt zuerst die p-Oxyphenylelessigsäure aus, die aus Benzol rein erhalten wird. Durch Auskochen der konzentrierten Mutterlauge mit Benzol erhält man beim Erkalten der filtrierten Lösung p-Oxyphenylpropionsäure.

¹⁾ E. Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chemie **4**, 309 (1882).

²⁾ A. Magnus-Levy, Festschrift für Salkowski **1904**, 253.

15. Homogentisinsäure (Dioxyphenyllessigsäure) $C_8H_8O_4$.



Eigenschaften. Die Homogentisinsäure kristallisiert mit 1 Mol. Wasser in großen, durchsichtigen Prismen, die bei gewöhnlicher Temperatur unter Verlust des Kristallwassers undurchsichtig werden und bei 146,5—147° C schmelzen. Sie löst sich leicht in Wasser, Alkohol und Äther, ist fast unlöslich in Chloroform und Benzol und Petroleumäther. Sie reduziert ammoniakalische Silberlösung sofort in der Kälte, alkalische Kupferlösung bei schwachem Erwärmen, alkalische Wismutlösung dagegen nicht. Mit dem Millonschen Reagens bildet sich ein zitronengelber Niederschlag, der beim Erwärmen ziegelrot wird. Eisenchlorid gibt eine vorübergehende Blaufärbung; beim Kochen mit Eisenchloridlösung tritt der Geruch nach Chinon auf. Unter den Salzen ist das kristallwasserhaltige 3 H₂O-Bleisalz zu nennen, das in Nadeln und in Prismen kristallisiert vom Schmelzpunkt 214—215° C. In Alkohol und Äther ist es unlöslich, in Wasser schwer löslich.

Die Methode von Wolkow und Baumann¹⁾ führt man in der Weise aus, daß man den Harn mit 75 ccm einer 1:12 verdünnten Schwefelsäure pro 1 Liter ansäuert, auf dem Wasserbade bis auf den zehnten Teil einengt, 4—5 mal mit dem dreifachen Volumen Äther auszieht, den Äther abdestilliert. Die sirupartige Flüssigkeit wird nun in der 30 bis 60 fachen Menge Wasser gelöst, die Lösung filtriert, dann erhitzt, mit 30 ccm einer konzentrierten Bleiessiglösung versetzt und heiß filtriert; beim Erkalten scheidet sich das Bleisalz in großen prismatischen Kristallen aus.

Garrod²⁾ verfährt bei der Darstellung der Homogentisinsäure so, daß er den Harn zuerst zum Sieden erhitzt, zu je 100 ccm Harn 5—6 g festes Bleiazetat hinzusetzt und, nachdem es sich gelöst hat, filtriert und das Filtrat an einem kühlen Orte stehen läßt, wobei sich das Bleisalz der Säure ausscheidet. Dieses wird nun getrocknet, fein gepulvert, mit Wasser verrieben, mit Schwefelwasserstoff versetzt, das Filtrat auf dem Wasserbade verdunstet und der Kristallisation überlassen, wobei sich die freie Säure in fast farblosen Kristallen ausscheidet.

Darstellung. Nach E. Meyer³⁾ dampft man den mit Schwefelsäure versetzten Harn ein, schüttelt 3—4 mal mit etwas Alkohol enthaltendem Äther aus, destilliert den Äther ab, löst den Rückstand in Alkohol und leitet in die Lösung Salzsäuregas ein. Hierauf verdünnt man die Lösung stark mit Wasser, neutralisiert mit Soda und schüttelt mit Äther aus. Beim Verdunsten des Äthers kristallisiert der Äthylester der Homogentisinsäure, der aus Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert wird. Er schmilzt bei 119—120° C.

Schumm⁴⁾ versetzt 220 ccm Harn mit 30 ccm einer 25 prozentigen

¹⁾ Wolkow und Baumann, Über das Wesen der Alkaptonurie. Zeitschr. f. physiol. Chemie 15, 228 (1891).

²⁾ A. E. Garrod, Alkaptonuria, a simple method for the extraction of homogentisinic acid from the urine. Journ. of Physiol. 23, 512 (1898/99).

³⁾ E. Meyer, Über Alkaptonurie. Deutsch. Archiv f. klin. Mediz. 70, 443 (1901).

⁴⁾ Schumm, Beiträge zur Kenntnis der Alkaptonurie. Münchn. mediz. Wochenschr. 51, 1599 (1904).

Salzsäure, dampft auf dem Wasserbade bis auf 25—30 ccm ein, spült den Rückstand mit etwa 100 ccm Alkohol in einen Erlenmeyerkolben über, fügt 10 ccm rauchende Salzsäure hinzu und setzt den Kolben in ein lebhaft siedendes Wasserbad. Nach einer Stunde verdünnt man den Kolbeninhalt mit etwa 300 ccm Wasser, macht die Flüssigkeit mit Soda schwach alkalisch, schüttelt dreimal mit je 80 ccm Äther aus, destilliert den größten Teil des Äthers ab, verjagt dann auf dem Wasserbade den Rest des Äthers und Alkohols und läßt den sirupösen Rückstand stehen, wobei er sich in einen Kristallbrei verwandelt. Dieser wird aus Wasser umkristallisiert, und man erhält auf solche Weise den reinen Ester.

Quantitative Bestimmung. Das von Baumann ¹⁾ angegebene Verfahren besteht darin, daß man 10 ccm filtrierten Harn in einem Kölbchen mit 10 ccm dreiprozentigem Ammoniak versetzt, sofort einige Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$ -Normalsilberlösung hinzufließen und 5 Minuten stehen läßt. Hierauf fügt man 5 Tropfen einer 10 prozentigen Chlorkalziumlösung und 10 Tropfen Ammoniumkarbonatlösung hinzu, schüttelt um und filtriert. Das so erhaltene bräunlich gefärbte, ganz klare Filtrat prüft man in der Weise, daß man es mit Silbernitrat versetzt — tritt dabei sofort wieder eine starke Abscheidung von Silber ein, so muß man bei dem zweiten Versuch etwa das Doppelte bis Dreifache $\frac{1}{10}$ -Normalsilberlösung zu der Mischung 10 ccm Harn und 10 ccm Ammoniak hinzusetzen. Ist die zur Oxydation nötige Silbernitratmenge annähernd ermittelt worden, so prüft man mit Salzsäure, um die Endreaktion zu fixieren; und dies ist erreicht, wenn das Filtrat vom Silberniederschlag auf Zusatz von verdünnter Salzsäure in geringer Menge nur noch eine sichtbare Trübung von Chlorsilber gibt. Die Nähe der Endreaktion erkennt man schon dann, wenn die tiefbraune Flüssigkeit durch Salzsäure hellrot wird. Erfordert das Gemisch mehr als 8 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsilberlösung, so fügt bei der Wiederholung des Versuches 20 ccm Ammoniak statt der angewandten 10 ccm hinzu. 1 g wasserfreie Homogentisinsäure reduziert 240—245 ccm der $\frac{1}{10}$ -Normalsilberlösung, demnach entspricht 1 ccm der $\frac{1}{10}$ -Normalsilberlösung 0,004124 g Homogentisinsäure.

Methode von Denigès²⁾.

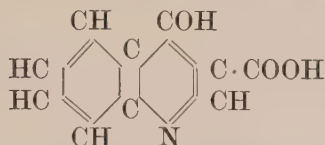
Man versetzt 10 ccm filtrierten Harn mit 10 ccm Ammoniak und $\frac{1}{10}$ -Normalsilbernitratlösung, läßt 5 Minuten stehen, wobei Reduktion eintritt, fügt hierauf des leichteren Filtrierens wegen 5 Tropfen einer 10 prozentigen Kalziumchloridlösung und $\frac{1}{2}$ ccm Ammonium- oder Natriumkarbonatlösung hinzu, füllt das Gemisch auf 50 ccm auf, filtriert. Von diesem Filtrat versetzt man nun 25 ccm mit 5 ccm Ammoniak, 50 ccm Wasser, 10 ccm auf $\frac{1}{10}$ -Normalsilbernitratlösung eingestellte Zyankaliumlösung, sowie 5 Tropfen Jodkaliumlösung (1: 4) und titriert

¹⁾ E. Baumann, Über die Bestimmung der Homogentisinsäure im Alkaptonharn. Zeitschr. f. physiol. Chemie **16**, 268 (1892).

²⁾ Denigès, Journ. Pharm. Chim. (6) **5**, 50 (1897).

mit $\frac{1}{10}$ -Normalsilbernitratlösung bis zu einer bleibenden Opaleszenz. Die beim Zurücktitrieren verbrauchte Silbermenge entspricht der durch die Homogentisinsäure reduzierten.

16. Kynurensäure (γ -Oxy- β -Chinolinkarbonsäure) $C_{10}H_7NO_3$.



Die Kynurensäure bildet feine farblose Nadeln, die bei $266\text{--}267^\circ \text{C}$ unter Kohlensäureentwicklung schmelzen. Sie ist fast unlöslich in kaltem, leichter in heißem Wasser, schwer löslich in kaltem, leichter in heißem Alkohol und Äther, leicht löslich in Alkalilaugen und kohlensauren Alkalien.

Nachweis. Beim Eindampfen von Kynurensäure in einem Porzellanschälchen mit Salzsäure und chlorsaurem Kali auf dem Wasserbade bis zur Trockne bleibt ein rötlicher Rückstand zurück, der beim Anfeuchten mit Ammoniak sich zunächst braungrün, nach kurzer Zeit smaragdgrün färbt. Beim Erwärmen färbt sich der Rückstand schmutzigviolett (Jaffé)¹⁾.

Darstellung. Hofmeister²⁾ versetzt eine größere Menge Harn mit $\frac{1}{10}$ Volumen konzentrierter Salzsäure, dann mit Phosphorwolframsäure, so lange noch ein Niederschlag ausfällt, filtriert, wäscht den Niederschlag mit 5prozentiger Schwefelsäure, preßt gut ab und zersetzt ihn mit Ätzbaryt in der Wärme. Hierauf wird filtriert, das gelöste Baryt durch Kohlensäure entfernt, das Filtrat eingedampft und noch warm mit Salzsäure bis zur stark sauren Reaktion versetzt, wobei ein brauner Niederschlag von Kynurensäure entsteht.

Quantitative Bestimmung. Nach Jaffé wird der zur Trockne eingedampfte Harn so oft mit neuen Portionen Alkohol ausgezogen, bis die ablaufende Flüssigkeit nicht mehr gefärbt erscheint. Hierauf dampft man die vereinigten Alkoholauszüge ein, löst den Rückstand in Wasser, versetzt mit konzentrierter Salzsäure und läßt 24 Stunden stehen, wobei sich ein Niederschlag ausscheidet. Dieser wird auf einem gewogenen Filter gesammelt, mit Wasser, Schwefelkohlenstoff und Äther gewaschen und gewogen, oder der Sirup wird in Wasser gelöst, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit Äther geschüttelt, wobei sich die Kynurensäure nach 24 Stunden rein ausscheidet.

Capaldi³⁾ verfährt so, daß er den Harn mit $\frac{1}{2}$ Volumen einer 5 Proz. konzentrierten Ammoniak enthaltenden 10 prozentigen Barytlösung versetzt, filtriert, bis auf $\frac{1}{3}$ der angewandten Harnmenge eindampft, 4 Proz. konzentrierte Salzsäure hinzufügt und 16—24 Stunden stehen läßt. Der ausgeschiedene Niederschlag wird abfiltriert, mit 1 prozentiger Salzsäure ausgewaschen, in ein Becherglas übergespült und in Ammoniak gelöst. Die Lösung wird auf dem Wasserbade bis

¹⁾ M. Jaffé, Eine empfindliche Reaktion auf Kynurensäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie **7**, 399 (1882).

²⁾ Fr. Hofmeister, Über die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen des Harnes. Zeitschr. f. physiol. Chemie **5**, 67 (1881).

³⁾ A. Capaldi, Ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Kynurensäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie **23**, 92 (1897).

zum Verschwinden des freien Ammoniaks erhitzt, filtriert, mit 4 Proz. konzentrierter Salzsäure gefällt und 6 Stunden stehen gelassen, wobei sich ein Niederschlag ausscheidet, der auf einem getrockneten und gewogenen Filter gesammelt, mit 1 prozentiger Salzsäure und zweimal mit Wasser nachgewaschen, bei 100 ° C getrocknet und dann gewogen wird.

17. Harnfarbstoffe und Chromogene.

Urochrom.

Eigenschaften. Das Urochrom ist amorph, von brauner Farbe, löst sich sehr leicht in Wasser und Alkohol, schwer in absolutem Alkohol, Essigäther, Amylalkohol und Azeton, löst sich nicht in Äther, Chloroform und Benzol. Von Bleiazetat, Silbernitrat, Merkuriazetat, Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure wird es gefällt.

Darstellung. Nach Garrod ¹⁾ wird 1 Liter Harn in gelinder Wärme mit Ammoniumsulfat gesättigt, filtriert und das Filtrat mit absolutem Alkohol (3 Volumen auf 10 Volumen gesättigten Harn) versetzt, wobei der Farbstoff in die sich auf der Salzlösung sammelnde, gelbe alkoholische Schicht übergeht. Den alkoholischen Auszug gießt man dann in viel Wasser und sättigt wieder mit Ammoniumsulfat, wodurch die alkoholische Farbstofflösung sich wieder abscheidet. Die alkoholische Lösung gießt man dann auf festes Ammoniumsulfat und erwärmt schwach, wobei sich zwei Schichten bilden. Die aufschwimmende Schicht wird unter Zusatz von Ammoniak zur Trockne eingedampft, der Rückstand 1—2 mal mit Essigäther behandelt, dann in eine Flasche gebracht, mit absolutem Alkohol übergossen und einige Stunden in verschlossener Flasche stehen gelassen. Der Alkoholauszug wird bis zur Orangefärbung eingedampft, in etwas mehr als sein Volumen Äther gegossen, der sich dabei ausscheidende Farbstoff durch ein mit Äther befeuchtetes Filter filtriert und mit Chloroform und absolutem Alkohol gewaschen.

Klemperer ²⁾ behandelt den Harn mit Tierkohle bis zur vollständigen Entfärbung, wäscht die Tierkohle mit Wasser, um Indikan und andere Stoffe zu entfernen, trocknet, erschöpft mit Alkohol und verwendet dann die alkoholische Lösung zur weiteren Reinigung nach Garrod.

Hohlweg ³⁾ isoliert das Urochrom aus Menschenharn in folgender Weise.

Der Harn wird mit Kalkmilch alkalisch gemacht, mit Chlorkalziumlösung ausgefällt, das Filtrat mit Salzsäure neutralisiert und im Vakuum bei niedriger Temperatur zum Sirup eingengt. Dieser wird mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und dann mit reiner, nicht allzu feinkörniger Tierkohle in der Schüttelmaschine mehrere

¹⁾ Garrod, *Proceed. Roy. Soc. Ger. B.* 55. *Journ. of Physiol.* 21 u. 29.

²⁾ G. Klemperer, *Die Messung des Harnfarbstoffes und ihre diagnostische Verwertbarkeit.* Berlin. *Klin. Wochenschr.* 40, 313 (1903).

³⁾ H. Hohlweg, *Zur Kenntnis des Urochroms.* *Biochem. Zeitschr.* 13, 199 (1908).

Stunden geschüttelt. Die Tierkohle wird auf einem Filter gesammelt, mit heißem Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion gewaschen, auf Tontellern bei 40 ° C getrocknet, mit konzentriertem Eisessig einige Stunden in der Schüttelmaschine geschüttelt, filtriert und die Eisessiglösung mit dem 10 fachen Volumen Äther versetzt, wobei sich der Farbstoff als harzige Masse ausscheidet, die dann bei 40 ° C getrocknet wird.

Salomonsen¹⁾ umgeht das Schütteln mit Tierkohle, indem er den eingengten Harn durch in 5 cm breiten und 50 cm langen Glasröhren befindliche Tierkohle in langsamem Strome filtriert, dann in derselben Weise durch einen Strom von Eisessig extrahiert. Der Eisessigauszug wird bei 35—40 ° C im Vakuum eingengt und der dickflüssige Rückstand mit dem 10 fachen Volumen Äther gefällt.

Mancini²⁾ vereinfachte das von Hohlweg und Salomonsen angegebene Verfahren in der Weise, daß er etwa 200 Liter nicht eingedampften Harn mit einer ammoniakalischen Lösung von Barium und Kalziumazetat ausfällt, das Filtrat mit Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit, schwach ansäuert und durch eine hohe Schicht Tierkohle filtriert. Das Auswaschen der Tierkohle bis zur Chlorfreiheit erwies sich als überflüssig. Die Kohle wird dann bei 50 ° C getrocknet und mit Eisessig bis zur Erschöpfung extrahiert. Der Eisessigextrakt wird im Vakuum bei 40 ° C auf ein Zehntel eingengt, vom ausgeschiedenen Kochsalz abfiltriert, mit Wasser verdünnt und im Vakuum bei 40 ° C bis zum Sirup eingengt.

Nach Dombrowski³⁾ versetzt man den Harn (10 Liter) zur Entfernung der Sulfate, Phosphate und der Harnsäure mit 86 g Kalziumazetat, 53 g Bariumazetat und 43 ccm 20 prozentigen Ammoniaks und filtriert nach mehrstündigem Stehen. Nach Neutralisation des Ammoniaks mit Essigsäure fügt man eine Lösung von Kupferazetat hinzu, deren saure Reaktion vorher mit Ammoniak abgestumpft war, und läßt den sich bald ausscheidenden amorphen, grünlichgrauen Niederschlag 24 Stunden stehen. Der auf einem Büchnerschen Filter gesammelte Niederschlag wird mit Wasser ausgewaschen, mit Wasser verrührt und mit Schwefelwasserstoff bei 50 ° C zerlegt. Nach Verjagen des Schwefelwasserstoffs im Vakuum in einer Kohlensäureatmosphäre unter gelindem Erwärmen wird die gelblichrote Flüssigkeit mit einem kleinen Überschuß einer Barytlösung versetzt, wobei ein gelber, flockiger Niederschlag entsteht, der abfiltriert wird. Der Barytüberschuß im Filtrat wird mit der Kohlensäure entfernt, die Flüssigkeit im Vakuum konzentriert und das Bariumsalz des Farbstoffes mit starkem Alkohol gefällt.

Quantitative Bestimmung. Nach Klemperer kann die Be-

¹⁾ K. F. Salomonsen, Zur Kenntnis des Urochroms. *Biochem. Zeitschr.* **13**, 205 (1908).

²⁾ S. Mancini, Zur Kenntnis des Urochroms. *Biochem. Zeitschr.* **13**, 208 (1908).

³⁾ St. Dombrowski, Über die chemische Natur des spezifischen Farbstoffes des Harns. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **54**, 188 (1907).

stimmung des Urochroms kolorimetrisch mit Hilfe einer Lösung von Echtgelb E geschehen. Wenn man 0,1 g dieses Farbstoffes in 1 Liter Wasser löst und von dieser Lösung 5 ccm mit Wasser zu 50 ccm verdünnt, so entspricht diese Lösung der Farbenstärke und Farbentönung einer Lösung von 0,1 Proz. Urochrom. Man hat also den Harn mit Wasser zu verdünnen, bis diese Farbenstärke erreicht wird. Der Vergleich geschieht in Gefäßen mit planparallelen Wandungen.

Die von Browinski und Dombrowski¹⁾ angegebene Methode beruht auf der Fähigkeit des Urochroms, Jodsäure unter Ausscheidung von Jod zu reduzieren.

800—1000 ccm Harn werden zur Entfernung der Harnsäure, Schwefelsäure und Phosphorsäure mit einer ammoniakalischen Lösung von Barium- und Kalziumazetat versetzt, der ausgeschiedene Niederschlag abfiltriert und das Filtrat mit Kupferazetat gefällt (s. Dombrowski unter Nachweis). Der so erhaltene Kupferniederschlag wird mit Wasser verrührt, mit Schwefelwasserstoff bei 50 ° C zersetzt, abfiltriert, der Schwefelwasserstoff aus dem Filtrate mit Kohlensäure im Vakuum verjagt und das Filtrat auf 150—200 ccm im Vakuum eingedampft. Die Farbstofflösung wird nun im Scheidetrichter mit einer 5 prozentigen Jodsäurelösung bis zur Blaufärbung eines mit Kongorot gefärbten Papierstreifens versetzt und darauf mit Schwefelkohlenstoff ausgeschüttelt, bis er kein Jod mehr aufnimmt. Der von der wässrigen Lösung getrennte Schwefelkohlenstoff wird mit Wasser bis zum Verschwinden der sauren Reaktion ausgewaschen und das darin gelöste Jod mit $\frac{1}{10}$ -Normalthiosulfatlösung titriert.

Vor dem Versuch muß das Reduktionsvermögen (gegenüber Jodsäure) einer Lösung von reinem Urochrom von bekanntem Gehalt bestimmt werden, um aus der gefundenen Jodmenge die Menge des Urochroms berechnen zu können. 0,2049 g Urochrom machen 0,02703 g Jod aus der Jodsäure frei. Da reines Urochrom im Mittel 11,15 Proz. N enthält, so muß 1 g Jod 7,580 g und 0,8452 g Urochrom-Stickstoff entsprechen.

Urobilin.

Eigenschaften. Das Urobilin ist amorph, je nach der Darstellungsweise braun, rötlich-braun, rot oder rotgelb, löst sich leicht in Alkohol, Amylalkohol und Chloroform, weniger leicht in Äther, Essigäther und in Wasser, die Löslichkeit in Wasser wird jedoch durch die Gegenwart von Neutralsalzen erhöht. Durch Sättigung mit Ammoniumsulfat, besonders nach Zusatz von Schwefelsäure, sowie durch Phosphorwolframsäure kann es aus dem Harn gefällt werden.

Die neutralen alkoholischen Urobilinlösungen sind bei größerer Konzentration braungelb, bei größerer Verdünnung gelb oder rosafarbig. Sie zeigen eine starke grüne Fluoreszenz. Die säurehaltigen alkoholischen Lösungen sind, je nach der Konzentration, braun, rotgelb oder rosenrot, sie fluoreszieren nicht, zeigen aber einen schwachen Absorptionsstreifen je zwischen b und F', der an F' angrenzt oder bei stärkerer Konzentration auch über F' hinausreicht. Die alkalischen Lösungen sind, je nach der Konzentration, braungelb, gelb oder (die ammoniakalischen) gelblich-grün. Setzt man der ammoniakalischen Lösung etwas Chlorzinklösung zu, so wird sie rot und zeigt eine prachtvolle grüne Fluoreszenz.

¹⁾ J. Browinski und St. Dombrowski, Über eine Methode der quantitativen Bestimmung von Harnfarbstoff. Journ. de physiol. et de pathol. 1908, 819.

reszenz. Diese Lösung, sowie auch die mit fixem Alkali alkalisch gemachten Lösungen zeigen einen dunkleren und schärfer begrenzten Streifen S, der zwischen b und F, ziemlich in der Mitte zwischen E und F liegt. Säuert man eine hinreichend konzentrierte Lösung von Urobilinalkali sehr vorsichtig mit Schwefelsäure an, so trübt sie sich und zeigt gerade auf E einen zweiten Streifen, der durch einen Schatten mit γ verbunden ist.

Nachweis. Zum Nachweis des Urobilins im Harn dient zunächst die Farbe des sauren bzw. alkalischen Harnes, ferner die schöne grüne Fluoreszenz des ammoniakalischen, mit Chlorzink versetzten Harnes und die Absorptionsstreifen im Spektrum. Gelingt der Nachweis mit dem Spektroskop nicht, so empfiehlt es sich, den Harn mit einer Mineralsäure zu versetzen und mit Äther oder besser mit Amylalkohol auszuschütteln und direkt oder nach Zusatz einer stark ammoniakhaltigen alkoholischen Chlorzinklösung spektroskopisch zu untersuchen.

Nencki und Rotschy¹⁾ säuern 10—20 ccm Harn mit einigen Tropfen Salzsäure, schütteln mit 5—10 ccm Amylalkohol aus und untersuchen die klar abgessene amyalkoholische Lösung spektroskopisch. Setzt man zu dieser Lösung einige Tropfen einer Lösung von 1 g Chlorzink in 100 ccm ammoniakhaltigem Alkohol, entsteht eine grüne Fluoreszenz.

Nach Schlesinger²⁾ erhält man unmittelbar schöne Fluoreszenz und deutliche Absorptionsspektren, wenn man den Harn mit dem gleichen Volumen einer 10 prozentigen Lösung von Zinkacetat in absolutem Alkohol fällt und von den ausgeschiedenen störenden Stoffen abfiltriert.

Darstellung. Die Darstellung des Urobilins geschieht nach Jaffé³⁾ in der Weise, daß man eine große Menge Harn mit Bleiessig fällt, den Niederschlag mit Wasser auswäscht, bei Zimmertemperatur trocknet, mit Alkohol mehrmals auskocht und mit kaltem, schwefelsäurehaltigem Alkohol versetzt. Das Filtrat wird mit Wasser verdünnt, mit Ammoniak übersättigt und mit Chlorzinklösung versetzt, wodurch ein Niederschlag entsteht, der mit Wasser chlorfrei ausgewaschen wird, mit Alkohol ausgekocht, nach dem Trocknen in Ammoniak gelöst und die Lösung mit Bleizucker gefällt. Der rote Niederschlag wird mit Wasser gewaschen, mit Alkohol ausgekocht, getrocknet, dann mit schwefelsäurehaltigem Alkohol versetzt. Das Filtrat vermischt man mit dem halben Volumen Chloroform, verdünnt mit Wasser und schüttelt mehrmals durch. Die abgelassene Chloroformlösung wird ein- bis zweimal mit wenig Wasser gewaschen, das Chloroform abdestilliert, wobei das Urobilin zurückbleibt.

Nach der von Méhn angegebenen und Fr. Müller und Huppert⁴⁾ modifizierten Methode verfährt man in folgender Weise.

Zur Entfernung der Harnsäure und des Hämatoporphyrins versetzt man 100 Teile Harn mit 30 Teilen einer alkalischen Chlorbariumlösung, die aus einer Mischung von 1 Teil gesättigter Chlorbariumlösung und 2 Teilen gesättigtem Barytwasser besteht, filtriert, fügt zum Filtrat konzentrierte Natriumsulfatlösung, um den überschüssigen Baryt zu entfernen. Hierauf wird die Flüssigkeit mit Schwefelsäure nahezu neutralisiert, filtriert und mit Ammoniumsulfat gesättigt. Der ausgeschiedene Niederschlag wird auf dem Filter mit gesättigter Ammonium-

¹⁾ M. Nencki und A. Rotschy, Zur Kenntnis des Hämatoporphyrins und des Bilirubins. Monatshefte d. Chemie **10**, 568 (1889).

²⁾ W. Schlesinger, Deutsche mediz. Wochenschrift **29**, 561 (1903).

³⁾ M. Jaffé, Zur Lehre von den Eigenschaften und der Abstammung der Harnpigmente. Virchows Archiv **47**, 405 (1869).

⁴⁾ Nach Neubauer-Vogel-Huppert.

sulfatlösung gewaschen, getrocknet, dann mit verdünnter Schwefelsäure versetzt und mit einer Mischung von 1 Teil Äther und 2 Teilen Alkohol in der Wärme extrahiert. Der Alkohol-Ätherauszug wird mit Chloroform gemischt, mit dem doppelten Volumen Wasser ausgeschüttelt, die abgeschiedene Chloroformlösung mit dem doppelten Volumen Wasser gewaschen und das in Lösung befindliche Urobilin durch Ausschütteln mit ammoniakalischem Wasser ausgezogen. Aus dieser Lösung verjagt man das Ammoniak durch Erwärmen. Den Farbstoffgehalt kann man spektrophotometrisch bestimmen.

Garrod und Hopkins¹⁾ änderten das Méhnsche Verfahren derart, daß sie zuerst die Harnsäure durch Sättigen mit Salmiakabscheidung, das Filtrat mit Ammoniumsulfat sättigen, wodurch ein Niederschlag von Urobilin entsteht. Dem Niederschlag wird nach dem Trocknen das Urobilin mit viel Wasser entzogen, die Lösung von neuem mit Ammoniumsulfat gefällt und diese Manipulation, wenn nötig, mehrmals wiederholt. Der zuletzt erhaltene Niederschlag wird getrocknet und in absolutem Alkohol gelöst.

Oder man verfährt nach denselben Autoren so, daß man diesen mit Chlorammonium sättigt, filtriert, das Filtrat mit Schwefelsäure ansäuert, mit Ammoniumsulfat sättigt und mit dem gleichen Volumen einer Mischung von einem Volumen Chloroform und 2 Volumen Äther schüttelt. Dem Äther-Chloroformauszug wird das Urobilin mit schwach alkalihaltigem Wasser leicht entzogen.

Die von Hoppe-Seyler²⁾ angegebene Methode besteht darin, daß man 100 cem Harn mit Schwefelsäure ansäuert, mit Ammoniumsulfat sättigt und mehrere Stunden stehen läßt. Der abfiltrierte Niederschlag wird auf dem Filter mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen, abgepreßt und mit einem Gemisch von gleichen Teilen Alkohol und Chloroform extrahiert. Die Alkohol-Chloroformlösung wird filtriert, mit Wasser ausgeschüttelt, bis sich die Chloroformschicht ganz klar abscheidet. Die Chloroformlösung läßt man in einem gewogenen Glas auf dem Wasserbade verdunsten, trocknet den Rückstand bei 100 ° C und extrahiert dann mit Äther. Die ätherische Lösung wird filtriert, der Rückstand auf dem Filter in Alkohol gelöst, in denselben Bechergläse zur Trockne eingedampft, getrocknet und gewogen.

Urobilinogen. Das Urobilinogen ist farblos oder nur sehr schwach gefärbt. Es löst sich in Äther, Chloroform, Amylalkohol und Essigester. Es zeigt kein Absorptionsband im Spektrum und wird unter dem Einflusse des Sonnenlichtes und des Sauerstoffes leicht in Urobilin umgewandelt. Nach der Angabe von Sallet³⁾ kann es dem mit Essigsäure angesäuerten Harn mit Essigäther entzogen werden.

Quantitative Bestimmung. Die Bestimmung des Urobilins neben Urobilinogen kann auch spektrophotometrisch ausgeführt werden.

¹⁾ A. Garrod und G. Hopkins, On Urobilin. Journ. of Physiol. **20**, 118 (1896).

²⁾ G. Hoppe-Seyler, Über Ausscheidung des Urobilins in Krankheiten. Virchows Archiv **124**, 30 (1891).

³⁾ Sallet, De l'urobiline dans les Urines normales. Revue de Médecine **17**, 109 (1897).

Nach Sallet liegt die Grenze für die Wahrnehmbarkeit des Absorptionsbandes einer sauren Urobilinlösung bei einer Konzentration von 1 mg Urobilin in 22 ccm Lösung, wenn die Dicke der Flüssigkeitsschicht 15 mm beträgt. Zur quantitativen Bestimmung muß man also die Urobilinlösung bis zu dieser Grenze verdünnen und dann die Menge aus dem bekannten Flüssigkeitsvolumen berechnen. 100 ccm des frisch gelassenen, vor Licht geschützten Harnes werden mit Essigsäure angesäuert, bei Petroleumlicht mit Essigäther ausgeschüttelt und das gelöste Urobilinogen mit Salpetersäure zu Urobilin oxydiert. Durch Zusatz von Ammoniak und Schütteln mit Wasser geht das Urobilin in die wässrige Lösung über. Nun säuert man mit Salzsäure an und verdünnt, bis die obige Grenze erreicht wird.

Das Prinzip des von Charnas¹⁾ ausgearbeiteten Verfahrens zur Darstellung und quantitativen Bestimmung des Urobilins und Urobilinogens ist folgendes: Der urobilinhaltige Harn wird vergoren, angesäuert und ausgeäthert, die Urobilinogenlösung, wenn nötig, durch Petroläther von beigemengtem Farbstoffe befreit. Sodann wird das Urobilinogen entweder direkt mit Hilfe der Ehrlichschen Reaktion quantitativ bestimmt oder durch Belichtung in Urobilin übergeführt, dieses durch Aussalzung weiter gereinigt und zur Wägung gebracht.

Die Methode wird in folgender Weise ausgeführt: 500 oder 1000 ccm des urobilinhaltigen, frischen, mit keinem konservierenden Mittel versetzten Harnes werden bis zur alkalischen Reaktion mit Ammoniumkarbonatlösung versetzt und 1—2 Tage im Brutofen stehen gelassen. Hierauf wird der Harn in einem sehr geräumigen, offenen Gefäße durch Zusatz einer gesättigten Weinsäurelösung stark sauer gemacht (heftiges Aufschäumen!), ein etwa ausfallender Niederschlag sofort abgesaugt und die Flüssigkeit mit dem $\frac{1}{2}$ —2 fachen Volumen Äther ausgeschüttelt (keine Emulsion). Die Ätherschicht wird wiederholt mit einem kleinen Volumen Wasser gewaschen. Ist diese stark gefärbt (Blutgehalt des Harnes), so wird das gleiche Volumen Petroläther hinzugefügt und der sich abscheidende Farbstoff durch wenig Wasser entfernt. In der fast farblosen ätherischen Urobilinogenlösung kann das Urobilin entweder spektrophotometrisch oder gewichtsanalytisch bestimmt werden.

Im ersten Falle wird die Lösung in einem Meßzylinder abgemessen und zur Ermittlung des E der Aldehydreaktion folgendermaßen verfahren: Bei nicht allzu geringem Urobilinogengehalte der Lösung mischt man 1—2 ccm der Ätherlösung mit 0,2—0,5 ccm einer kalt gesättigten ätherischen Lösung von Dimethylparaamidobenzaldehyd in einem 10 ccm fassenden, mit eingeschliffenem Stöpsel versehenen Meßzylinder, fügt 2—3 Tropfen mit trockenem Salzsäuregas gesättigten Alkohols hinzu und schüttelt 2—3 Minuten lang kräftig. Dann verdünnt man mit einer passenden Menge Alkohol auf ein bestimmtes Volumen und bringt die Lösung in den Trog des Spektrophotometers (Schultzescher Trog, ca. 3 ccm fassend). Die Messung erfolgt im Bereiche des

¹⁾ D. Charnas, Über die Darstellung, Verhalten und quantitative Bestimmung des reinen Urobilins und Urobilinogens. Bioch. Zeitschr. 20, 401 (1909).

dunkelsten Teiles des Absorptionsstreifens (λ 550—570) in der üblichen Weise. Die Reaktion wird einigemal unter Variation der Konzentration ausgeführt. Die Berechnung geschieht nach der Formel $C = AE$, wo für E der Mittelwert der gefundenen Extinktionskoeffizienten und $A = 0,000017$ zu setzen ist. C bedeutet dann das Gewicht Urobilinogen in Grammen, das in 1 ccm der ätherischen Lösung enthalten war. Bei sehr geringem Urobilinogengehalt versetzt man 10 ccm der Ätherlösung im Meßzylinder mit 0,2—0,3 ccm der gesättigten Aldehydlösung und 2—4 Tropfen der alkoholischen Salzsäure, schüttelt 2 Minuten und fügt eine passende Menge (mindestens 2 ccm) Wasser hinzu; somit ist der ganze Farbstoff in der wässrigen Schicht enthalten, der überstehende farblos aussehende Äther wird abgegossen. Man erhält auf solche Weise die Summe Urobilin + Urobilinogen, in Urobilin ausgedrückt, man kann aber auch bei Weglassung des Gärungsvorganges das im Harne enthaltene Urobilinogen für sich bestimmen.

Will man das Urobilin gewichtsanalytisch bestimmen, so versetzt man die ätherische Urobilinogenlösung im Scheidetrichter mit dem gleichen Volumen reinen Wassers und läßt einen Tag im direkten Sonnenlichte stehen, wobei alles Urobilinogen in Urobilin umgewandelt wird. Die wässrige Urobilinlösung wird filtriert, mit reinstem Ammoniumsulfat in Substanz gesättigt, der Niederschlag auf einem dichten Filter gesammelt, lufttrocken mit möglichst wenig absolutem Alkohol extrahiert, die filtrierte alkoholische Lösung in einem gewogenen Schälchen über Phosphorpentoxyd im Vakuum bei Zimmertemperatur getrocknet und gewogen.

Uroerythrin.

Eigenschaften. Das Uroerythrin ist amorph, von rosa Farbe, löst sich etwas schwer in Wasser, Alkohol, Chloroform, leichter in Essigäther, am leichtesten in Amylalkohol. Vom Licht, besonders in Lösung, wird es zerstört. Konzentrierte Schwefelsäure färbt eine Uroerythrinlösung schön karminrot, Salzsäure gibt eine rosa Farbe, Alkalien eine grasgrüne Farbe, wobei oft ein Farbenwechsel von rosa zu purpur und blau stattfindet. Die sehr verdünnten Uroerythrinlösungen haben rosa Farbe, die konzentrierteren sind rötlich-orange oder feuerrot. Sie fluoreszieren weder direkt noch nach Zusatz von ammoniakalischer Chlorzinklösung, zeigen aber eine starke Absorption des Spektrums, die in der Mitte zwischen D und E anfängt, etwa, bis zum F sich erstreckt und aus zwei breiten Streifen besteht, die durch einen Schatten zwischen E und b verbunden sind.

Nachweis. Zum Nachweis des Farbstoffes dient sein spektroskopisches Verhalten, die Farbe der verschiedenen Lösungen, das Verhalten gegen Säuren und Alkalien (s. o.).

Darstellung. Garrod ¹⁾ gibt folgendes Verfahren zur Darstellung des Uroerythrins an. Man löst das Sediment in Wasser bei gelinder Wärme und sättigt mit Salmiak, wobei sich der Farbstoff mit dem Ammoniumurat ausscheidet, und wäscht den Niederschlag mit gesättigter Ammoniumchloridlösung, bis alles Urobilin entfernt worden ist. Man digeriert zuletzt den Niederschlag auf dem Filter im Dunkeln

¹⁾ A. Garrod, A contribution to the study of uroerythrin. Journ. of Physiol. 17, 439 (1894/5).

mit warmem Alkohol, versetzt dann die alkoholische Lösung mit dem doppelten Volumen Wasser, entfernt das Hämatoporphyrin durch Schütteln mit Chloroform, säuert die Farbstofflösung mit Essigsäure an und schüttelt mit Chloroform, das das Uroerythrin löst. Man wäscht nun die Chloroformlösung mit Wasser und läßt das Chloroform im Dunkeln bei gelinder Wärme verdunsten.

Urorosein.

Eigenschaften. Das Urorosein ist in Wasser, verdünnten Mineralsäuren, Äthyl- und Amylalkohol leicht löslich. Das Urorosein wird im Lichte bald zerstört, und es zeigt einen scharf begrenzten Absorptionsstreifen zwischen D und E. Der in einem skatoxyreichen Harn nach Salzsäurezusatz auftretende rote Farbstoff ist zum Unterschied von Urorosein unlöslich in Wasser, aber leicht löslich in Chloroform.

Nachweis. Versetzt man den zu prüfenden Harn mit einer Mineralsäure, besonders mit Salzsäure und etwas Chlorwasser oder Chlorkalk in der Kälte, so entsteht nach einigen Minuten das Urorosein. Das zugleich freiwerdende Indigo wird durch Ausschütteln mit Chloroform entfernt. Hierauf extrahiert man den Farbstoff mit Amylalkohol, schüttelt den amyalkoholischen Extrakt mit verdünnter Kalilauge oder Ammoniak, säuert den schwach gelben amyalkoholischen Auszug mit Salzsäure an, worauf die rote Farbe wieder auftritt¹⁾.

Darstellung. Der Harn wird mit einem Überschuß von Bleizucker versetzt, vom Niederschlag abfiltriert, das Filtrat mit überschüssigem Ammoniak versetzt und filtriert. Beide Niederschläge werden bei 70° C getrocknet und mit absolutem Alkohol ausgezogen, bis Proben auf Zusatz von Salzsäure und einer Spur Chlorwasser oder Chlorkalklösung sich nicht mehr rot färben. Die vereinigten Auszüge sättigt man mit Schwefelwasserstoff, filtriert, engt ein und fällt mit Äther in Fraktionen. Hierauf verdunstet man die alkoholätherische Lösung auf dem Wasserbade, extrahiert den Rückstand mit Äther, wodurch die Phenolkörper entfernt werden, löst den Rückstand in wenig Alkohol und versetzt mit Äther bis zur beginnenden Trübung. Das Chromogen kristallisiert in farblosen Nadeln.

Nach Staal²⁾ isoliert man das Urorosein in der Weise, daß man den Harn mit Ammoniumsulfat sättigt, vom ausgeschiedenen Niederschlag abfiltriert, das Filtrat auf dem Wasserbade eindampft, erkalten läßt und vom ausgeschiedenen Ammoniumsulfat abgießt. Hierauf versetzt man die Flüssigkeit mit Essigsäure bis zur schwach sauren Reaktion, schüttelt im Scheidetrichter mit Essigäther aus, der die Chromogene des Indigorotes und des Uroroseins aufnimmt. Hierauf wird die Chromogenlösung durch Schütteln mit Wasser vom Indikan befreit, wobei das Waschen so oft wiederholt wird, bis das Waschwasser mit Isatinsalzsäure nicht mehr reagiert. Dem Essigäther wird das Chromogen des Uroroseins durch Ausschütteln mit Kalilauge entzogen und die alkalische Lösung zum Aufbewahren mit Essigsäure neutralisiert.

¹⁾ H. Rosin, Über das sogenannte Urorosein, Harnrosa. Deutsche mediz. Wochenschr. 1893, 51.

²⁾ J. Staal, Über das Chromogen des sogenannten Skatolrotes im normalen Menschenharn. Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 236 (1905).

18. Flüchtige Fettsäuren.

Isolierung der Fettsäuren.

Zum Nachweis der flüchtigen Fettsäuren im Harn müssen diese zuerst isoliert werden. Dies geschieht durch Destillation des nativen oder mit fester Soda bis zur alkalischen Reaktion versetzten und konzentrierten Harns, am besten mit Wasserdampf oder im Vakuum ebenfalls mit Wasserdampf bei einem 10—15 mm Druck und einer Wasserbadtemperatur nicht über 60° C, um das Übergehen der Milchsäure zu verhindern, bei stets saurer Reaktion, die durch Schwefelsäure oder Phosphorsäure hergestellt wird. Die Menge der Säure muß so bemessen sein, daß stets ein Überschuß an freier Mineralsäure vorhanden ist, um das von der Spaltung des Harnstoffs herrührende Ammoniak zu neutralisieren. Man verwendet gewöhnlich für 100 ccm Harn 5 ccm konzentrierter Schwefelsäure, 10 ccm konzentrierter Salzsäure und 20 ccm 40 prozentiger Phosphorsäure; bei mit Sodazusatz konzentriertem Harn muß der Säurezusatz entsprechend erhöht werden. Die mit überdestillierende Salzsäure wird für die folgenden Analysen evt. mit Weinsäure unschädlich gemacht oder ihr Gehalt durch eine besondere Chlor-titration bestimmt und in Rechnung gesetzt.

Die im Destillat neben den Fettsäuren enthaltenen Phenole und Benzoessäuren werden in der Weise entfernt, daß man das Destillat mit Natriumkarbonat neutralisiert, eindampft und den Rückstand, wiederholt mit warmem absolutem Alkohol auszieht, wobei alles außer Kochsalz und überschüssigen Natriumkarbonat in Lösung geht. Die vereinigten Alkoholauszüge werden eingeeengt, der Rückstand in möglichst wenig Wasser gelöst, die Lösung mit 25 prozentiger Schwefelsäure angesäuert, im Eisschranke 12 Stunden stehen gelassen, wobei fast alle Benzoessäure ausfällt. Die Benzoessäure wird abgesaugt, mit eiskaltem Wasser nachgewaschen, das Filtrat mit Natriumkarbonat schwach alkalisch gemacht und mit Äther, der die Phenole aufnimmt, ausgeschüttelt. Die angesäuerte wässrige Schicht wird nun nochmals der Destillation unterworfen, so lange die übergehende Flüssigkeit noch sauer reagiert, und die Menge der im Destillat enthaltenen flüchtigen Säuren durch Titration eines genau gemessenen aliquoten Teiles mit $\frac{1}{100}$ -Normalnatronlauge bestimmt. Die Reindarstellung und Trennung der Fettsäuren durch fraktionierte Destillation nach ihren Siedepunkten ist der geringen Menge wegen nicht ausführbar; man scheidet daher die reinen Salze der Fettsäuren in folgender Weise aus.

Das Destillat wird mit Natronlauge oder Natriumkarbonat genau neutralisiert, auf dem Wasserbade vorsichtig konzentriert, wobei beim Stehen in Gegenwart von größeren Mengen Essigsäure sich Natriumazetat ausscheidet, das abgesaugt und durch Umkristallisieren gereinigt wird. Die mit verdünnter Schwefelsäure sauer gemachte Mutterlauge wird der nochmaligen Destillation unterworfen, das Destillat mit Barytwasser alkalisch gemacht und der überschüssige Baryt durch Einleiten von Kohlensäure in der Kälte und dann in der Wärme entfernt. Dieses Filtrat scheidet beim Stehen buttersaures Barium aus, während Bariumpropionat in Lösung bleibt.

Ist Ameisensäure zugegen, was man an der Schwärzung einer Silbernitratlösung erkennt, zerstört man sie durch Kochen des Destillats mit Quecksilber-

oxyd oder Merkurisalzen. Brasch und Neuberg entfernen die Ameisensäure in einer Weise, die als indirekte Bestimmung dienen kann. Das Destillat wird in einem Rundkolben mit Natriumkarbonat neutralisiert, mit 20 ccm Doppelt-normalschwefelsäure, 4 g festem Merkurisulfat versetzt und eine halbe Stunde am Rückflußkühler im gelinden Sieden erhalten, wobei sich das schwerlösliche Quecksilberoxydsulfat unter Kohlensäureentwicklung ausscheidet. Dieses wird nach dem Erkalten der Flüssigkeit abfiltriert, das Filtrat vom Quecksilber durch Schwefelwasserstoff entfernt, dieser durch einen lebhaften Luftstrom verjagt, die Schwefelsäure mit heißer Bariumhydroxydlösung in der Hitze gefällt und der Überschuß des Baryts durch Kohlensäure entfernt. Das Filtratengt man nun auf 25 ccm ein, filtriert vom etwa ausgefallenen Bariumkarbonat ab, versetzt die Lösung mit einigen Tropfen Silbernitratlösung und kocht auf, um die Spuren von Chloriden zu entfernen, und fällt schließlich das Filtrat mit konzentrierter Silbernitratlösung, wodurch man die vorhandenen Fettsäuren als Silbersalze erhält.

Die Menge der vorhandenen Ameisensäure läßt sich in der Weise ermitteln, daß man die vom Quecksilber befreite schwefelsaure Lösung nochmals destilliert und das Destillat nochmals titriert. Die Differenz zwischen diesem Wert und der Gesamtmenge der flüchtigen Fettsäuren vor der Behandlung mit Merkurisulfat ergibt die Menge Ameisensäure.

Trennung der Fettsäuren.

Das von Luek¹⁾ zur Trennung der Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure angegebene Verfahren beruht auf der verschiedenen Löslichkeit ihrer Barytsalze in absolutem Alkohol. So lösen 100 g absoluter Alkohol 0,0055 g Bariumformiat, 0,0284 g Bariumazetat, 0,2610 g Bariumpropionat und 1,1717 g Bariumbutyrat, so daß man die Säuren durch fraktionierte Kristallisation trennen kann.

Die Methode von Haberland²⁾. Das Destillat wird mit Phosphorsäure versetzt, die in Freiheit gesetzten Fettsäuren mit Wasserdampf abdestilliert, das Destillat mit Bleioxyd eingedampft, der Rückstand in kaltem Wasser gelöst und zum Sieden erhitzt. Nach einigem Stehen filtriert man das ausgeschiedene basisch propionsaure Blei ab, entbleit das Filtrat mit Schwefelsäure, filtriert, versetzt die Lösung mit Zinkoxyd, dampft zur Trockne ein und behandelt den Rückstand mit absolutem Alkohol, wobei ameisensaures und schwefelsaures Zink ungelöst bleiben, die man dann durch Destillation mit Phosphorsäure trennt. Die alkoholische Lösung des essigsauren und buttersauren Zinks wird zur Trockne verdampft, der Rückstand mit Phosphorsäure behandelt, die so freigemachten Säuren abdestilliert, durch kohlen-saures Silber in ihre Silbersalze übergeführt und durch ihre verschiedene Löslichkeit voneinander getrennt.

Muspratts Methode³⁾ beruht auf der verschiedenen Löslichkeit der Natriumsalze der Fettsäuren in absolutem Alkohol. So löst sich das Natriumsalz der Essigsäure zu 1,8 g in 100 ccm absolutem Alkohol, der Propionsäure zu 2,9 g, der normalen Buttersäure zu 4,0 g und der Isobuttersäure zu 17,8 g.

Lieben machte die Beobachtung, daß bei teilweiser Neutralisation stets die relativ niedrigsten Säuren sich zuerst binden und als

¹⁾ E. Luek, Zeitschr. f. analyt. Chemie **10**, 184 (1871).

²⁾ K. R. Haberland, Zeitschr. f. analyt. Chemie **38**, 225 (1899).

³⁾ M. Muspratt, Chem. Zentralbl. **1900**, I, 1039.

Salze im Destillationsrückstande bleiben, während die relativ höchsten als freie Säuren überdestillieren. Auf dieser Eigenschaft versuchte er eine Methode zur Trennung der flüchtigen Fettsäuren zu gründen. Die von verschiedenen Autoren erhaltenen Resultate stimmten aber nicht immer überein.

Nachweis und Bestimmung nach v. Jaksch¹⁾. Der Harn wird mit Phosphorsäure (auf 100 ccm Harn 15 ccm Säure von 1,25 Dichte) destilliert, das Destillat mit kohlensaurem Natron neutralisiert eingedampft, mit absolutem Alkohol die fettsauren Salze ausgezogen und diese durch Versetzen mit Silberlösung, salpetersaurem Quecksilberoxyd und Eisenchlorid auf Essigsäure und durch die eventuelle Silberreduktion auf Ameisensäure geprüft. — Zur quantitativen Bestimmung wird die konzentrierte alkoholische Lösung der Natronsalze mit Äther gefällt, die Salze auf ein Filter gebracht und als solche analysiert, oder sie werden durch Umsetzen mit der berechneten Menge salpetersauren Silbers in die Silbersalze verwandelt und diese in wässriger Lösung gekocht, filtriert, das Filtrat wieder gekocht und diese Operation so oft wiederholt, bis das Filtrat wasserklar abläuft, also alles ameisensaure Silber zersetzt ist.

Bessere Resultate sollen Fitz und Hecht²⁾ nach der von ihnen vorgeschlagenen Methode erhalten haben. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß bei der Destillation wässriger Lösungen der Säuren ohne Kalizusatz diejenige mit dem höchsten Molekulargewicht zuerst mit den Wasserdämpfen destilliert, die mit dem niedrigsten zuletzt. Bei der Destillation ist dafür Sorge zu tragen, daß die verdampfende Flüssigkeit stets durch Wasser ersetzt werden muß.

19. Milchsäure (Paramilchsäure) $C_3H_6O_3$.



Eigenschaften und Nachweis der Milchsäure s. S. 220.

Darstellung. Man säuert den Harn stark mit Schwefelsäure oder Phosphorsäure an, zieht mit großen Mengen Äther im Schütteltrichter und in einem Extraktionsapparat bis zur Erschöpfung aus oder versetzt den Harn mit gepulvertem Ammoniumsulfat (auf 1000 ccm Harn 300 g), oder man dampft nach Langstein und Neuberg³⁾ bis zur Sirupkonsistenz ein und vermischt mit fein pulverisiertem, geglühtem Kupfersulfat oder Natriumsulfat oder Kaliumbisulfat und behandelt die Masse in einem Soxhletapparat. Hierauf verdampft man den Äther, wobei ein Gemisch von Oxalsäure, Hippursäure, aromatischen und aliphatischen Substanzen mit Milchsäure zurückbleibt. Die

¹⁾ R. v. Jaksch, Über das Vorkommen von flüchtigen Fettsäuren im Urin unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen. Tageblatt der Naturforscherversammlung zu Straßburg 1885, 26.

²⁾ A. Fitz, Chem. Berichte 11, 46 (1878). — O. Hecht, Liebigs Annalen 209, 319 (1881).

³⁾ Langstein und Neuberg, Berichte der Berliner physiol. Gesellschaft 1902/3, 114.

Beimengungen werden durch Kochen mit Bleihydroxyd oder Bleikarbonat entfernt, der Niederschlag siedend heiß abfiltriert, das noch warme Filtrat mit Schwefelwasserstoff zur Entfernung des Bleisulfids behandelt, der Schwefelwasserstoff durch Kochen verjagt und die Lösung mit reinem Zinkkarbonat gekocht. Die so erhaltene Lösung wird auf dem Wasserbade konzentriert und der Kristallisation überlassen. Die ausgeschiedenen Kristalle werden mit Alkohol gewaschen und aus Wasser umkristallisiert.

Nach Lakemann¹⁾ wird der Harn durch Kochen mit verdünnter Schwefelsäure enteiweißt, mit Tierkohle entfärbt und die Schwefelsäure durch Bariumkarbonat entfernt. Das Filtrat wird eingedampft, mit Alkohol extrahiert, der alkoholische Auszug mit Tierkohle entfärbt, der Alkohol verdunstet und der Rückstand in Wasser gelöst und wieder mit Tierkohle gekocht. Das Filtrat wird alkalisch gemacht und zur Entfernung fettartiger Substanzen mit Äther ausgeschüttelt, dann mit Phosphorsäure angesäuert und wiederholt mit Äther ausgeschüttelt. Der so erhaltene ätherische Extrakt wird mit Natriumsulfat getrocknet, der Äther verjagt, der Rückstand mit Wasser und Bleikarbonat gekocht, nach dem Erkalten filtriert und mit Schwefelwasserstoff entbleit. Das Filtrat vom Bleisulfid wird durch Kochen vom Schwefelwasserstoff befreit, mit Zinkoxyd oder Zinkkarbonat gekocht, heiß filtriert und verdunsten gelassen, wobei sich die charakteristischen nadelförmigen Kristalle des Zink-d-Laktats ausscheiden. Mit dem so erhaltenen Zinksalz oder mit aus ihm dargestellter freier Milchsäure stellt man zur Identifizierung folgende Reaktionen und Proben an (s. S. 220).

20. Organische Phosphorverbindungen.

Nachweis. Sotnitschewsky²⁾ und Bülow³⁾ machten seinerzeit den Versuch, die Gegenwart der Glycerinphosphorsäure nachzuweisen, indem sie 10 Liter Harn mit einem Gemisch von Kalziumchlorid und Ätzkalk ausgefällt, filtriert, bis zur Sirupkonsistenz eingedampft, den Rückstand mehrmals mit heißem Alkohol extrahiert und den im Alkohol unlöslichen Teil in wässriger Lösung mit Magnesiamixtur gefällt haben, um die anorganischen Phosphate zu entfernen. Die Mutterlauge wurde dann der Hydrolyse mit kochender Schwefelsäure unterworfen, wobei sie anorganische Phosphorsäure abspaltete, die mit Magnesiamixtur ausgefällt wurde. Aus dem konzentrierten Filtrat wurde mit Alkohol ein Sirup extrahiert, der die Akrolein- und Borsäureperlenreaktion auf Glycerin gab.

Quantitative Bestimmung. Die organisch gebundene Phosphorsäure bestimmt man in der Weise, daß man in einer Harnprobe die anorganische Phosphorsäure mit Magnesiamixtur fällt und bestimmt und in einer anderen Probe die Gesamtphosphorsäure nach dem Veraschen mit Soda-Salpetermischung oder nach Neumann mit dem Salpetersäure-Schwefelsäuregemisch ermittelt. Die Differenz zwischen beiden Werten ergibt die Menge der organisch gebundenen Phosphorsäuren.

¹⁾ G. Lakemann, München. mediz. Wochenschr. 53, 299 (1906).

²⁾ Sotnitschewsky, Zeitschr. f. physiol. Chemie 4, 214 (1880).

³⁾ K. Bülow, Pflügers Archiv 57, 89 (1894).

21. Tierisches Gummi, Harndextrine.

Landwehr¹⁾ isolierte das tierische Gummi aus Harn in folgender Weise: Der Harn wird mit einer genügenden Menge Kupfersulfat und dann mit Natronlauge in großem Überschuß versetzt, wodurch die Kupferoxydverbindung des Kohlehydrates in klauen Flocken ausfällt, die auch beim Sieden der Flüssigkeit nicht schwarz werden. Die abfiltrierten Flocken werden mit Wasser gewaschen, getrocknet, in möglichst wenig konzentrierter Salzsäure gelöst und die Lösung mit dem dreifachen Volumen Alkohol versetzt, wodurch zunächst nur eine Trübung entsteht, die erst bei 60 ° C in eine flockige Fällung übergeht. Man filtriert ab, wäscht aus, löst in Wasser und fällt nochmals mit Alkohol. Der Niederschlag stellt ein weißes, stickstoffreies Pulver dar, das sich von anderem tierischen Gummi nicht unterscheidet. Ärmerer Harn wird zunächst bis zur bleibenden Trübung mit dem 3—4 fachen Volumen 90 prozentigen Alkohols versetzt und bis zur flockigen Ausfällung erwärmt. Die Flocken werden gesammelt, in wenig Wasser gelöst, von anorganischen Salzen abfiltriert und dann in oben erwähnter Weise mit Kupfersulfat und Natronlauge behandelt.

Baisch²⁾ stellt das Harndextrin durch Benzoylierung und nachfolgende Verseifung der Benzoyl ester dar, wobei er den Harn zuerst mit Bleiazetat oder mit Natronlauge behandelt. Der frische, sauer reagierende Harn wird mit 150 ccm einer konzentrierten Lösung von neutralem Bleiazetat pro Liter Harn versetzt, so lange noch ein Niederschlag entsteht. Das überschüssige Blei wird mit Schwefelwasserstoff, dieser noch vor dem Filtrieren des ausgeschiedenen Schwefelbleies durch Einleiten von Kohlensäure oder besser Luft entfernt und dann mit 40 ccm und der zehnfachen Menge Natronlauge versetzt und einige Stunden stehen gelassen, bis sich der Niederschlag zu Boden setzt. Hierauf filtriert man durch ein kleines Filter, wäscht den pulverigen und leicht gelb gefärbten Niederschlag aus. Oder der Harn wird in Portionen von je 5 Litern nach dem Entfernen der Phosphate mit Natronlauge mit den oben angegebenen Mengen von Benzoylchlorid und Natronlauge versetzt, bis zum Verschwinden des Geruchs nach Benzoylchlorid geschüttelt, die Niederschläge nach dem Abfiltrieren ausgewaschen, noch bevor sie trocken sind, mit verdünnter Salzsäure zerrieben, bis zum Verschwinden der Salzsäurereaktion im Filtrat ausgewaschen und getrocknet.

Die Verseifung des so erhaltenen Esters geschieht in der Weise, daß man je 10 g Ester in eine Lösung von 7,5 g metallischem Natrium in 300 ccm absolutem Alkohol unter beständigem Umschütteln und Abkühlen allmählich einträgt und die Temperatur auf — 5 ° C erhält; die Verseifung ist ungefähr nach 20—40 Minuten zu Ende. Diesen Punkt erkennt man dadurch, daß eine herausgenommene Probe, mit dem 3—4 fachen Volumen Wasser versetzt, sich nicht mehr trübt. Dann fügt man sofort so viel verdünnte Schwefelsäure zu, als zur Überführung des verwendeten Natriums in primäres Natriumsulfat nötig ist, schüttelt zur Entfernung der Benzoesäure dreimal mit ungefähr denselben Mengen Äther unter Zusatz von Alkohol zur Entfernung der Emulsionsbildung aus, wäscht die einzelnen Ätherauszüge mit je 100 ccm Wasser zweimal aus, vereinigt das Waschwasser mit der wässrig-alkoholischen Lösung, aus der sich Kristalle von primärem Natriumsulfat ausscheiden. Die alkoholisch-wässrige Lösung wird nun mit Natronlauge unter Umrühren so lange versetzt, bis die Reaktion eben noch deutlich sauer ist, und der Säureüberschuß dann genau abgestumpft. Zur vollständigen Entfernung des Natriumsulfats versetzt man mit dem 2—3 fachen Volumen Alkohol und läßt über Nacht stehen. Die vom Natriumsulfat abfiltrierte Flüssigkeit wird in einer Schale auf dem Wasserbade bis zum Verschwinden des Alkohols erwärmt, wobei die Reaktion weder alkalisch noch stärker sauer sein darf, als sie durch Lackmus eben angezeigt wird. Gibt eine herausgenommene Probe mit Alkohol noch eine Fällung, so versetzt man die Lösung nochmals mit dem 4—5 fachen Volumen Alkohol, filtriert und dampft wieder ein, wobei man eine gelb bis bräunlich gefärbte Lösung erhält, die bei weiterem Konzentrieren amorphe bräunliche Massen ausscheidet. Versetzt man noch einmal mit viel starkem Alkohol, so entsteht wieder eine Fällung, die neben kristallinen Substanzen auch amorphe Beimengungen erkennen läßt. Die

¹⁾ H. A. Landwehr, Tierisches Gummi, ein normaler Bestandteil des menschlichen Harnes. *Zentraltl. f. die mediz. Wissensch.* 1885, 369.

²⁾ K. Baisch, Über die Natur der Kohlehydrate des normalen Harns. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 18, 191 (1893/4), 19, 339 (1894).

Filtration dieses Alkoholniederschlags erfolgt nach längerem Erwärmen auf dem Wasserbade und darauffolgendem Stehen. Den Niederschlag löst man in heißem Wasser und fällt mit Alkohol.

Die so erhaltene Substanz zeigt folgende Eigenschaften: Sie wird aus ihrer wässrigen Lösung durch Alkohol gefällt und bildet beim Erwärmen einen flockigen Niederschlag. Sie gibt noch in starker Verdünnung deutliche Furfuroreaktion, reduziert die Fehlingsche Lösung nicht. Mit Kupfersulfat und Natronlauge gibt sie einen blauen, flockigen, beim Kochen sich nicht schwärzenden Niederschlag, läßt sich aber durch verdünnte Schwefelsäure in eine die alkalische Kupferlösung reduzierende Substanz überführen. Sie gibt keine Glykogen- und keine Eiweißreaktion. Mit Benzoylchlorid und Natronlauge gibt sie einen in Wasser unlöslichen Niederschlag.

Salkowski¹⁾ stellte sein Harndextrin dar, indem er 18—20 Liter Harn bis zur Sirupkonsistenz eindampfte, stehen ließ und von den ausgefallenen Salzen dekantierte. Hierauf versetzte er die Lösung mit einem mehrfachen Volumen 96 prozentigen Alkohols, wodurch wieder ein Niederschlag entstand, der abfiltriert wurde. Das alkoholische Filtrat wurde konzentriert, mit absolutem Alkohol gefällt, der Niederschlag mit Wasser aufgenommen, von den unlöslichen harnsauren Salzen abfiltriert und das Filtrat gegen fließendes Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion dialysiert, was etwa 60 Stunden dauert. Das Dialysat wurde eingeeengt, nochmals mit absolutem Alkohol gefällt, das Filtrat mit Merkuriazetat unter Zusatz von Natriumkarbonat versetzt, von dem abgeschiedenen Niederschlag abfiltriert und das Filtrat vom Quecksilber durch Schwefelwasserstoff befreit. Nach dem Verjagen des Schwefelwasserstoffs durch Kochen oder durch einen Kohlensäurestrom wurde die Flüssigkeit mit Bleiessig versetzt, um die Oxyssäuren zu entfernen. Das Filtrat wurde nun mit Bleisubazetat und Ammoniak ausgefällt, der Niederschlag in Wasser suspendiert, durch Schwefelwasserstoff zerlegt, die Lösung eingedampft und mit Alkohol gefällt, wodurch das Dextrin sich in schneeweißem Zustande ausschied.

Dieses Produkt unterscheidet sich von den nach anderen Verfahren dargestellten durch seinen Stickstoffgehalt, durch die Fällbarkeit durch Bleiessig und Ammoniak, sowie Phosphorwolframsäure in saurer Lösung. Gegen Diastase ist das Dextrin beständig, durch Jod wird es nicht gefärbt. Im übrigen ist dieses Produkt dem auf anderem Wege hergestellten tierischen Gummi ähnlich.

22. Gepaarte Glukuronsäuren.

Eigenschaften. Die gepaarten Glukuronsäuren drehen links und werden bei der Behandlung mit verdünnten Mineralsäuren meist erst in der Wärme unter Wasseraufnahme in Glukuronsäure und einen Paarling gespalten. Nach der Spaltung zeigen sie Rechtsdrehung und Reduktion der Fehlingschen Lösung; manche reduzieren Fehlingsche Lösung direkt beim Erwärmen.

Nachweis. Phlorogluzinprobe. Man versetzt 3—4 ccm Harn mit dem gleichen Volumen starker Salzsäure und etwas Phlorogluzin und erwärmt, so erhält man eine kirschrote Lösung, die einen charakteristischen Absorptionstreifen im Grün zwischen D und E zeigt.

Orzinprobe (Modifikation nach A. Neumann). Versetzt man 10 Tropfen Harn in einem Reagenzglas mit 5 ccm Eisessig und einigen Tropfen 5 prozentiger alkoholischer Orzinlösung, erhitzt zum Sieden und gibt unter starkem Umschütteln tropfenweise konzentrierte Schwefelsäure hinzu, so tritt Blaugrünfärbung oder Smaragdnuance mit einem Band im Rot (vor C) auf. Den Schwefelsäurezusatz muß man unterbrechen, sobald ein deutlicher Farbumschlag eingetreten ist, denn ein Überschuß führt infolge Zersetzungen Mißfärbung herbei; mehr als 50 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure dürfen nicht zugesetzt werden.

Naphthoresorzinprobe von B. und C. Tollens²⁾. Zu 5 ccm Harn setzt man 0,5 ccm einer 1 prozentigen alkoholischen Naphthoresorzinlösung und 5 ccm konzentrierte Salzsäure hinzu, erhitzt bis zum Sieden und erhält im Sieden mit ganz kleiner Flamme noch eine Minute. Nach 4 Minuten langem Stehen kühlt

¹⁾ E. Salkowski, Berliner klin. Wochenschr. 1910.

²⁾ C. Tollens, Der Nachweis von Glukuronsäure nach B. Tollens im menschlichen Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie 56, 115 (1908). Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. 41, 1778 (1908).

man die Flüssigkeit ab, fügt das gleiche Volumen Äther hinzu, schüttelt gut durch, so färbt sich die nach kurzer Zeit klar abgesetzte Ätherschicht schön blau, bei geringerem Glukuronsäuregehalt violett und zeigt im Spektrum ein deutliches Band in der Gegend der Natriumlinie. Die bei der Reaktion entstehende blaue Substanz ist ätherlöslich zum Unterschied von Arabinose und Xylose, sowie von den übrigen Zuckerarten gelieferten Stoffen, die unlöslich sind. Diese Reaktion ermöglicht auf solche Weise eine Differenzierung der Glukuronsäure von den Fünfkohlenstoffzuckern.

Nach den Beobachtungen von Mandel und Neuberg¹⁾ reagieren mit Naphthoresorzin und Salzsäure auch die analogen Aldehyd- und Ketonensäuren. Nach den neueren Untersuchungen von C. Tollens ist aber die Glukuronsäurereaktion von den anderen wohl zu unterscheiden.

Darstellung. Der Harn wird auf dem Wasserbade zum dünnen Sirup eingeeengt, mit einer Mischung von 1 Liter Äther, 500 ccm 90 prozentigem Alkohol und 30 ccm Schwefelsäure (konzentrierte Schwefelsäure zu gleichen Teilen mit Wasser verdünnt) so lange ausgeschüttelt, bis keine optisch-aktive Substanz mehr übergeht. Die Alkohol-Ätherauszüge werden abdestilliert, der Rückstand mit Barythydrat neutralisiert, das ausgeschiedene schwefelsaure Barium abfiltriert, das Filtrat zuerst mit Bleizucker, dann mit Bleiessig vorsichtig gefällt, der Bleiessigniederschlag gut ausgewaschen, in Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff versetzt. Das vom Schwefelwasserstoff durch Erwärmen auf dem Wasserbade befreite Filtrat wird bis zu einem dünnen Sirup eingedampft und stehen gelassen, wobei sich gepaarte Glukuronsäure ausscheidet, die durch Lösen in warmem Wasser und Entfärben mit Tierkohle fast rein erhalten wird (E. Külz)²⁾.

Nach Wiedemann stellt man die gepaarten Glukuronsäuren dar, indem man den Harn mit Ammoniak versetzt und mit Bleiessig fällt, filtriert, den ausgewaschenen Niederschlag in Wasser suspendiert und mit Ammoniumkarbonat versetzt. Das Filtrat behandelt man in der Wärme mit Bariumhydroxyd, bis alles Ammoniak entwichen ist, und entfernt den überschüssigen Baryt durch Einleiten von Kohlensäure. Aus der abfiltrierten und eingedampften Lösung wird durch Zusatz von Alkohol die Bariumverbindung der Glukuronsäure gefällt.

Das Verfahren von Schmiedeberg und Meyer³⁾ bei der Darstellung der Kamphoglukuronsäuren besteht darin, daß man den bis zur Sirupdicke eingedampften Harn mit einer genügenden Menge feuchten Bariumhydroxyds versetzt, das Gemisch erwärmt und dann mit Alkohol behandelt. Neben vielen anderen Harnbestandteilen bleibt eine basische Bariumverbindung der stehenden Säuren ungelöst. Der Rückstand wird in einer reichlichen Menge Wasser suspendiert, filtriert und nach Zusatz neuer Mengen von Bariumhydroxyd auf dem Wasserbade eingeeengt, wobei eine in Wasser schwer lösliche, amorphe, basische Bariumverbindung entsteht. Diese wird auf dem Filter ausgewaschen und zur Gewinnung der freien Säure mit Schwefelsäure versetzt.

¹⁾ J. Mandel und C. Neuberg, Naphthoresorzin als Reagens auf einige Aldehyd- und Ketonensäuren. *Biochem. Zeitschr.* **13**, 148 (1908).

²⁾ E. Külz, Über einige gepaarte Glukuronsäuren. *Zeitschr. f. Biologie* **27**, 247 (1890).

³⁾ O. Schmiedeberg und H. Meyer, Über Stoffwechselprodukte nach Kampferfütterung. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **3**, 422 (1879).

Quantitative Bestimmung. Furfurol-Salzsäuredestillationsmethode von C. Tollens¹⁾. 250 ccm Harn werden mit 150 ccm Bleiessig und 5 ccm Ammoniak versetzt, mehrere Stunden stehen gelassen, mit Hilfe der mit doppeltem, gehärtetem Filter versehenen Nutsche wird zunächst die klare, überstehende Flüssigkeit entfernt, dann der Niederschlag aufs Filter gebracht und mit der Saugpumpe allmählich stärker abgesaugt. Der Niederschlag wird nun sorgfältig mit etwa 750 ccm destilliertem Wasser ausgewaschen, wobei man das jedesmal aufgegossene Quantum Wasser so weit absaugt, bis sich Risse im Niederschlag zu bilden beginnen, da sich beim weiteren Saugen tiefe, lange Risse bilden, durch die das Waschwasser schnell und häufig getrübt durchläuft. Den Niederschlag läßt man an einem warmen Orte, z. B. in der Nähe einer Heizung usw., so lange trocknen, bis er rissig geworden und vom Rande losgesprungen ist, und bringt ihn dann samt dem Filtrierpapier quantitativ in den 1-Literkolben des Destillationsapparates. Man fügt 100 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,060 hinzu und destilliert, wobei man jedesmal, wenn 30 ccm in die Vorlage übergegangen sind, von neuem 30 ccm derselben Salzsäure durch den Hahntrichter zufließen läßt. Die Destillation wird so lange fortgesetzt, bis die Furfurolprobe nicht mehr positiv ausfällt.

Die Furfurolprobe wird so angestellt, daß man einen Tropfen des aus dem Kühler fließenden Destillates auf einen Streifen Filtrierpapier fallen läßt. Daneben bringt man einen Tropfen des Furfurolreagens, so daß die Ränder der Tropfen ineinander überfließen. Beim Vorhandensein von Furfurol bildet sich hier ein roter Teilring. (Das Furfurolreagens ist eine frische Lösung von gleichen Teilen Wasser und Anilin, der so lange konzentrierte Essigsäure zugetropft ist, bis die [plötzlich eintretende] Klärung erfolgt ist.)

Man muß im allgemeinen 400—500 ccm übergehen lassen, bis die Reaktion negativ wird. Nach der Destillation fügt man unter kräftigem Umschütteln eine Phlorogluzinlösung (Phlorogluzinum purissimum) in erwärmter Salzsäurelösung vom spezifischen Gewicht 1,060 (man nimmt doppelt so viel Phlorogluzin, als man Furfurolphlorogluzid erwartet; es genügen gewöhnlich 0,25 g) hinzu und füllt genau auf 400 oder 500 ccm auf, wobei zuerst Braunfärbung, dann dichte schwärzliche Trübung auftritt. Nach 16 stündigem Stehen filtriert man durch einen mit Asbest beschickten Goochtiiegel, der vorher sehr gründlich im Gas-muffelofen ausgeglüht, baldmöglichst in das im Trockenschranke bei 98° C getrocknete Wägegläschen gestellt und mit diesem zusammen nach dem Abkühlen gewogen wird. Das Filtrieren und Auswaschen geschieht mit Hilfe einer schwach wirkenden Saugpumpe, wobei man stets genau 150 ccm destilliertes Wasser nehmen muß. Man läßt beim Absaugen des Waschwassers nur so viel Wasser abfließen, daß der Niederschlag eine feuchte Oberfläche behält, dann fügt man neues Wasser hinzu und

¹⁾ C. Tollens, Quantitative Bestimmung der Glukuronsäure im Urin mit der Furfurol-Salzsäuremethode. Zeitschr. f. physiol. Chem. 61, 93 (1909).

verfährt ebenso. Im zu trocknen Niederschlag bilden sich Risse, durch die das Waschwasser trübe abläuft und auch Teilchen des Niederschlages mit sich reißt. Das Auswaschen muß sorgfältig geschehen bis zur vollständigen Entfernung der Salzsäure, die beim Trocknen einen sehr merklichen Einfluß auf das Gewicht haben kann. Der Tiegel wird nun in das im Trockenschrank stehende Wägegias gebracht, und nach 4 Stunden stellt man das zugedeckte Wägegias in den Exsikkator und wiegt nach dem Erkalten.

Durch Multiplikation des gefundenen Furfurolphlorogluzidgegewichtes mit 3 erhält man das Gewicht des entsprechenden Glukuronsäurelaktons. Da im Destillat + Waschwasser eine genau berechnete Menge Phlorogluzids gelöst bleibt, so muß diese Menge dem erhaltenen Resultat hinzuaddiert werden, und zwar: Es lösen sich in 550 ccm Destillat + Waschwasser 0,0051—0,0052 g Phlorogluzid, in 650 ccm 0,0060 bis 0,0061 g.

23. Schwefelhaltige Verbindungen.

Man unterscheidet unter dem im Harn vorkommenden Schwefel vollkommen oxydierten „sauren“ Schwefel der Sulfate und der Ätherschwefelsäuren und „neutralen“ Schwefel einer Reihe von Verbindungen, die zum Teil aus Rhodanalkali, unterschwefliger Säure, Zystin oder seinen Abkömmlingen, Chondroitinschwefelsäure, Proteinstoffen, zum größten Teil aber aus Oxyprotein säure, Alloxyprotein säure, Uroferinsäure und Schwefelwasserstoff bestehen.

a) Gesamtschwefel.

Man dampft 25 ccm Harn in einer Nickelschale bis auf ein kleines Volumen ein, fügt 20 g Salpetermischung hinzu und erhitzt vorsichtig mit kleiner Spiritusflamme, bis die Substanz schmilzt und die Schmelze weiß geworden ist. Hierauf löst man die Schmelze in einer Porzellanschale in Wasser, fügt vorsichtig 100 ccm Salzsäure hinzu, läßt auf dem Wasserbade stehen, bis die Gasentwicklung aufgehört hat, und dampft mit Salzsäure einigemal auf dem Wasserbade bis zur Trockne ein, bis die Salpetersäure vollständig entfernt ist. Den Rückstand löst man dann in Wasser, filtriert von der Kieselsäure ab, wäscht das Filter aus, erhitzt bis zum beginnenden Sieden, versetzt mit 10 ccm heißer Bariumchloridlösung und läßt einige Stunden stehen. Dann bringt man den Niederschlag auf ein aschefreies Filter, prüft das Filtrat mit Schwefelsäure auf genügenden Chlorbariumzusatz, wäscht den Niederschlag mit heißem Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion, dann zweimal mit absolutem Alkohol und zweimal mit Äther zur Entfernung von etwaigen Farbstoffen. Niederschlag samt Filter bringt man in einen gewogenen Platintiegel, erhitzt anfangs mit kleiner Flamme bis zum Verkohlen des Filters, dann mit größerer so lange, bis das Bariumsulfat absolut weiß geworden ist, läßt erkalten und wägt. Hierauf befeuchtet man den Tiegelinhalt mit einigen Tropfen Schwefelsäure, trocknet, erhitzt und glüht; nach dem Erkalten wägt man wieder.

Bequemer gestaltet sich die Oxydation mit Natriumsuperoxyd.

Asboth¹⁾ mischt 25 ccm eingedampften Harn in einem Nickeltiegel mit 7,5 g kalzinierter Soda, 10 g Natriumsuperoxyd und erwärmt mit einer kleinen Spiritusflamme, so daß sie den Tiegel nicht berührt. Sobald die Mischung zusammensintert und zu schmelzen anfängt, erhitzt man mit größerer Flamme, bis die Schmelze dünnflüssig geworden ist. Die abgekühlte Schmelze wird dann in Wasser gelöst, mit bromhaltiger Salzsäure angesäuert, bis zum Verschwinden des Broms gekocht, filtriert und mit heißer Bariumchloridlösung in der Siedehitze gefällt. Der Niederschlag wird, wie oben angegeben, weiter behandelt.

Modrakowski²⁾ verfährt in der Weise, daß er 25—50 ccm Harn in einer Nickelschale mit 1—2 g Natriumsuperoxyd auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz eindampft und dann weitere 2—3 g Natriumsuperoxyd in kleinen Mengen unter Umrühren hinzufügt. Sobald die Reaktion nachgelassen hat, erwärmt man mit einer Spiritusflamme, bis die Wasserdampfentwicklung aufgehört hat, erhitzt dann weiter mit starker Spiritusflamme, wenn nötig, unter nochmaligem Zusatz von Natriumsuperoxyd, bis die Masse dickflüssig geworden ist. Die kalte Schmelze löst man dann in Wasser, säuert mit Salzsäure an, fällt mit Bariumchlorid und verfährt weiter, wie oben angegeben ist.

Abderhalden und Junk³⁾ modifizieren die von Pringsheim angegebene Methode in folgender Weise: 10 ccm Harn werden mit wenig Soda und 0,4 g reinem Milchezucker auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit 6,4 g Natriumsuperoxyd gut gemischt, der Tiegel in eine Porzellanschale mit kaltem Wasser gestellt und der Inhalt durch einen durch das im Deckel befindliche Loch eingeführten glühenden Eisennagel entzündet. Nach dem Erkalten wird der Tiegel schnell umgestürzt, die Schale rasch mit einem Uhrglas bedeckt und der Inhalt der Schale und des Tiegels schnell in ein Becherglas gebracht und nach Ansäuern mit Salzsäure wie üblich mit Chlorbarium gefällt.

Das von Schulz⁴⁾ zur Bestimmung des Gesamtschwefels auf nassem Wege aufgestellte Verfahren wurde von Konschegg⁵⁾ modifiziert. Man versetzt 5—10 ccm Harn in einem 300 ccm fassenden Kjeldahlkolben mit der gleichen Menge rauchender Salpetersäure und 1—2 ccm einer 20 prozentigen Kaliumnitratlösung und erhitzt zuerst über freier Flamme und bei Entwicklung weißer Dämpfe über einem Drahtnetz so lange, bis keine Dampfentwicklung mehr stattfindet

¹⁾ Asboth, Neue Methode zur Bestimmung des Schwefels in organischen Verbindungen. Chemikerzeitung 1895, 2040.

²⁾ G. Modrakowski, Über die Schwefelbestimmung im Harne mittels Natriumsuperoxyd. Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 562 (1903).

³⁾ E. Abderhalden und C. Junk, Die Schwefelbestimmung im Urin. Chem. Ber. 41, 4267 (1908).

⁴⁾ Hugo Schulz, Eine Methode zur Bestimmung des Gesamtschwefels im Harn. Pflügers Archiv 57, 57 (1894). Die quantitative Bestimmung des Gesamtschwefels im Harn. Ibidem 121, 11 (1908).

⁵⁾ Konschegg, Zur Bestimmung des Gesamtschwefels im Harn. Pflügers Archiv 123, 274 (1908).

und am Halse des Kolbens keine Flüssigkeitstropfen mehr zu sehen sind. Der abgekühlte Kolbeninhalt wird in einem Becherglas mit Wasser verdünnt, dann mit Salzsäure versetzt, aufgeköcht und mit heißem Bariumchlorid in der Siedehitze gefällt.

Benedict ¹⁾ wendet Kupfernitrat als Oxydationsmittel an, indem er 10 ccm Harn mit 7—8 ccm einer Mischung von 200 g kristallisiertem Kupfernitrat und 50 g Natrium- oder Kaliumchlorat in 1 Liter Wasser eindampft, nach dem Trocknen über der Flamme stark glüht, den Rückstand in verdünnter Salzsäure löst und mit Bariumchlorid fällt.

Ritson ²⁾ empfiehlt, statt Natriumsuperoxyd eine Mischung von Natriumsuperoxyd und Bariumsuperoxyd im Verhältnis von 7:1 anzuwenden, so daß bei der Oxydation zugleich Bariumsulfat entsteht.

b) Gesamtschwefelsäure.

Man erhitzt 100 ccm unverdünnten eiweißfreien Harn mit 10 ccm Salzsäure (vom spezifischen Gewicht 1,12) 15 Minuten auf dem Drahtnetze, versetzt mit Bariumchloridlösung im Überschuß und erwärmt auf dem Wasserbade, bis sich der Niederschlag vollständig abgesetzt hat. Der Niederschlag wird mit heißem Wasser chlorfrei, dann mit Alkohol und Äther ausgewaschen, geglüht, gewogen und die gefundene Menge Bariumsulfat auf Schwefelsäure berechnet.

c) Ätherschwefelsäure.

Baumann bestimmt die Ätherschwefelsäure, indem er zuerst die Sulfatschwefelsäure aus dem mit Essigsäure angesäuerten Harne mit Bariumchlorid ausfällt und dann durch Sieden mit Salzsäure die Ätherschwefelsäuren zersetzt und die freigewordene Schwefelsäure als Bariumsulfat fällt.

Nach Salkowski verfährt man in der Weise, daß man 200 ccm Harn mit dem gleichen Volumen einer Barytlösung aus 2 Volumen gesättigter Barythydrat- und 1 Volumen gesättigter Bariumchloridlösung fällt, filtriert, 100 ccm des die Ätherschwefelsäuren enthaltenden Filtrates mit 10 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,12 versetzt, 15 Minuten kocht und auf dem Wasserbade erwärmt, bis sich der Niederschlag vollständig abgesetzt hat, und verfährt weiter wie oben angegeben. Aus der Differenz zwischen der ermittelten Ätherschwefelsäure und der Gesamtschwefelsäure berechnet sich die Menge der Sulfatschwefelsäure.

d) Neutraler Schwefel.

Nach Lépine läßt sich ein Teil des neutralen Schwefels direkt mit Chlor oder Brom zu Schwefelsäure oxydieren, während der andere erst durch Schmelzen mit Kali und Salpeter in Schwefelsäure überführbar

¹⁾ R. Benedict, The estimation of total sulphur in urine. Biochem. Journ. 6, 363 (1909).

²⁾ S. Ritson, The use of barium peroxyde in the estimation of total sulphur in urine. Biochem. Journ. 4, 343, (1909).

ist. W. Smith ¹⁾ ist der Ansicht, daß der am schwersten oxydierbare Teil des neutralen Schwefels in Form von Sulfosäuren vorkommt.

Die Menge des neutralen Schwefels erhält man durch Subtraktion derjenigen der Gesamtschwefelsäure von der nach der Oxydation ermittelten Schwefelsäuremenge oder durch Bestimmung des Schwefelsäuregehaltes in dem bei der Ermittlung der Gesamtschwefelsäure erhaltenen Filtrate. Man verfährt dann bei Abwesenheit von unterschweifliger Säure nach Salkowskis Angabe wie folgt. Das Filtrat samt dem Waschwasser wird bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, mit der Salpetermischung in einer Platinschale bis zur Trockne eingedampft und mit kleiner Flamme geschmolzen. Die Schmelze wird nun in Wasser gelöst, vom kohlen sauren Baryt abfiltriert und dieser mit Wasser nachgewaschen, wobei eine Probe sich vollständig in Salzsäure lösen muß, wenn nicht, muß der Niederschlag mit kohlen saurem Natrium aufgeschlossen werden. Im Filtrat wird die Schwefelsäure wie gewöhnlich bestimmt.

Heß ²⁾ bestimmt den neutralen Schwefel, indem er das Filtrat von der ausgefällten Gesamtschwefelsäure in einem Kolben (der einen mit Pyrogallussäure und Lauge beschickten Kugelapparat trägt) mit Natronlauge stark alkalisch macht und mit Chlorgas sättigt. Nach einigen Stunden säuert man das Reaktionsgemisch mit Salzsäure an, erhitzt, um das Chlor zu verjagen, wobei sich ein feiner Niederschlag von schwefelsaurem Baryt ausscheidet, das man wie gewöhnlich bestimmt.

e) Rhodanwasserstoff.

Nachweis. Man säuert etwa 200 ccm Harn mit Salpetersäure an, fällt mit Silbernitrat, verteilt den abfiltrierten Niederschlag in Wasser, zersetzt ihn durch Einleiten von Schwefelwasserstoff, filtriert, destilliert das Filtrat, das man auf Blausäure prüft, indem man etwas Eisenvitriol und etwas Eisenchlorid hinzufügt und mit Salzsäure versetzt, wobei eine grüne bis blaue Färbung oder blauer Niederschlag (Berliner Blau) entsteht (J. Munk) ³⁾.

Quantitative Bestimmung. Man fällt 100 ccm Harn mit Salpetersäure und Silbernitrat, filtriert den Niederschlag ab, wäscht ihn aus und schmilzt mit dem Salpetergemisch. Die aus dem Schwefel des Rhodanwasserstoffs gebildete Schwefelsäure wird als Bariumsulfat in der üblichen Weise bestimmt. 1 Teil Bariumsulfat entspricht 0,253 g Rhodanwasserstoff (Munk).

Lang ⁴⁾ ermittelte durch Titration nach Volhard (s. S. 323) die Gesamtmenge der im Harne enthaltenen Chloride und Rhodanide. Dann verascht er eine andere Portion Harn mit dem Salpetergemisch und bestimmt in der Asche den Chlorgehalt. Die Differenz beider Resultate ergibt den Rhodanwasserstoffgehalt.

¹⁾ W. Smith, Zeitschr. f. physiol. Chem. 17.

²⁾ L. Heß, Methode zur Bestimmung des neutralen Schwefels im Harn. Berliner klin. Wochenschr. 45, 1452.

³⁾ J. Munk, 1. Quantitative Bestimmung des Schwefelzyansäuregehaltes im Speichel. 2. Über das Vorkommen von Sulfozyansäure im Harn und ihre quantitativen Verhältnisse. Virchows Archiv 69, 350 (1877).

⁴⁾ S. Lang, Über die Umwandlung des Acetonitrins und seiner Homologen im Tierkörper. Arch. f. exper. Pharm. 34, 246 (1894).

Das Ruppssche¹⁾ Verfahren in der Ausführung von Edinger und Clemens²⁾ besteht darin, daß man 100 ccm Harn mit Salpetersäure bis zur sauren Reaktion versetzt, mit 3 prozentiger Silbernitratlösung fällt, erwärmt etwa 10 Minuten auf dem Wasserbade, filtriert den Niederschlag ab, wäscht mit salpetersäurehaltigem Wasser nach und bringt ihn samt Filter in eine Literflasche mit Glasstopfen. Hierauf fügt man etwa 3 g Natriumkarbonat und 3 g Jodkalium hinzu, um das Chlorsilber in Jodsilber zu überführen, löst die Salze durch Umschwenken, läßt eine gemessene Menge $\frac{1}{10}$ -Normaljodlösung bis zur deutlichen Braunfärbung hinzufließen, verschließt die Flasche und läßt in einem dunklen Raum 2 Stunden stehen. Man säuert dann mit 10 prozentiger Salzsäure an und titriert mit $\frac{1}{10}$ -Normalthiosulfatlösung unter Benutzung von Stärkelösung als Indikator. 1 ccm $\frac{1}{10}$ -Normaljodlösung entspricht 0,0009666 g Rhodanwasserstoff.

f) Unterschweiflige Säure $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Nachweis. Die Thioschwefelsäure weist man im Harn am einfachsten nach, indem man ihn mit starker Salzsäure versetzt, der Harn wird bei ihrer Anwesenheit milchigtrübe und scheidet nach einigen Tagen mit anderen Substanzen Schwefel ab, den man durch Ausschütteln mit frisch gereinigtem Schwefelkohlenstoff erhalten kann.

Darstellung. Die Darstellung der unterschweifligen Säure in Form ihres Barytsalzes erfolgt nach Schmiedeberg in der Weise, daß man Hunde- oder Katzenharn mit Kalkmilch und salpetersaurem Kalk fällt, das Filtrat vom Kalk durch Kohlensäure befreit, mit Essigsäure oder Salpetersäure neutralisiert und mit Bleiessig fällt. Der Bleiniederschlag wird mit Wasser ausgewaschen, mit kohlensaurem Ammoniak zerlegt, mit Tierkohle entfärbt, dann mit Barythydrat erwärmt, solange Ammoniak entweicht, der überschüssige Baryt mit Kohlensäure entfernt und das Filtrat bis zur Kristallisation eingedampft.

Nach Meißner wird der Harn mit Barytwasser im Übersusse behandelt, das Filtrat eingedampft und mit Alkohol gefällt, wobei ein weißer dicker Niederschlag entsteht. Dieser löst sich zum größten Teil in kochendem Wasser, und beim Eindampfen und darauffolgendem Erkalten der Lösung scheidet sich das thioschwefelsaure Barium in schönen farblosen Kristallen ab.

Quantitative Bestimmung. Salkowski³⁾ destilliert 100 ccm Harn mit 10 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,12, bis im Kolben $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{4}$ des Inhaltes zurückgeblieben ist, wobei sich die unterschweiflige Säure in Schwefel und schweflige Säure spaltet. Bei Anwesenheit von Thioschwefelsäure tritt im obersten Teil des Kühlers ein Beschlag von Schwefel auf, bei größeren Mengen geht der Schwefel in Form eines

¹⁾ E. Rupp und A. Schiedt, Über die Jodometrie des Rhodanwasserstoffs. Chem. Berichte 35, 2191 (1902).

²⁾ Edinger und Clemens, Weitere Untersuchungen über die Bedeutung der Rhodanverbindungen im Tierkörper. Zeitschr. f. klin. Mediz. 59, 218 (1906).

³⁾ E. Salkowski, Über das Verhalten der Isaethionsäure im Organismus und den Nachweis der unterschweifligen Säure im Harn. Pflügers Archiv 39, 209 (1886).

gelblichweißen Pulvers in die Vorlage über. In das Destillat geht schwefelige Säure über, die durch Zink und Salzsäure zu Schwefelwasserstoff reduziert wird. Man versetzt das Destillat mit etwas Salzsäure und einem Zinkstäbchen, erwärmt gelinde und läßt eine halbe Stunde stehen. Schwärzung eines mit Bleiazetat getränkten Papierstreifens beweist die Gegenwart von schwefliger Säure.

Nach Presch¹⁾ verfährt man in der Weise, daß man 100 ccm Harn zur Entfernung der präformierten Schwefelsäure mit Barytmischung fällt, vom ausgeschiedenen Bariumsulfat abfiltriert, das ammoniakalisch gemachte Filtrat mit kohlensaurem Ammonium fällt und stehen läßt, wobei sich Bariumkarbonat ausscheidet. Das Filtrat vom Bariumkarbonat wird mit Salpetersäure neutralisiert, mit Silbernitrat versetzt, gelinde erwärmt und stehen gelassen. Dann filtriert man, dampft das Filtrat ein und versetzt es mit salpetersaurem Barium, wobei sofort oder erst nach einigem Stehen ein Niederschlag aus Chlorsilber und aus Barytsalzen ausfällt. Der Niederschlag wird mit Ammoniak und dann mit Wasser gewaschen, wodurch das Chlorsilber und Bariumnitrat entfernt werden, während Bariumsulfat zurückbleibt, dessen Menge auf Thioschwefelsäure umgerechnet werden kann.

g) Schwefelwasserstoff.

Nachweis. Man bringt den Harn in ein Kölbchen, das man mit einem Stopfen verschließt. Zwischen Kork und Kolbenhals klemmt man ein Stückchen Filtrierpapier, das mit Bleiazetatlösung und Natronlauge befeuchtet ist. Bei Anwesenheit von Schwefelwasserstoff färbt es sich braun und schwarz.

Schwefelwasserstoff färbt einen mit einer Lösung von Nitroprussidnatrium und einem Tropfen verdünnter Natronlauge befeuchteten Streifen Filtrierpapier purpurrot.

Quantitative Bestimmung. Die geringsten Spuren von Schwefelwasserstoff lassen sich in der Weise bestimmen, daß man das Gasgemenge durch eine mit überschüssiger Natronlauge versetzte Bleizuckerlösung streichen läßt, das ausgefällte Schwefelblei auf einem Filter sammelt, trocknet, im Platintiegel verbrennt, den Rückstand in Salpetersäure löst, mit Schwefelsäure versetzt, das ausgeschiedene Bleisulfat trocknet, glüht und wiegt. Die gefundene Menge Bleisulfat, mit 0,1124 multipliziert, gibt die Menge Schwefelwasserstoff.

h) Chondroitinschwefelsäure $C_{18}H_{26}NO_{12}SO_3OH$.

Quantitative Bestimmung. Zur quantitativen Bestimmung der im Harn ausgeschiedenen Chondroitinschwefelsäure benutzte Pons²⁾ ihre Eigenschaft, nicht durch Scheidewände zu diffundieren. Durch Hydrolysieren mit Säure wird nachher aus der Chondroitinschwefelsäure die Schwefelsäure abgespalten und durch Bestimmung der letzteren die erstere ermittelt.

¹⁾ W. Presch, Über das Verhalten des Schwefels im Organismus und den Nachweis der unterschwefligen Säure im Menschenharn. Virchows Archiv 119 148 (1890).

²⁾ Ch. Pons, Quantitative Untersuchungen über die Ausscheidung der Chondroitinschwefelsäure. Hofmeisters Beiträge 9, 393 (1907).

250—500 ccm filtrierten Harnes werden 3—5 Tage in Dialysierschläuchen gegen fließendes Leitungswasser dialysieren gelassen, dann mit 10 ccm Barytwasser versetzt und nach 24 stündigem Stehen durch ein Barytfilter bis zur vollständigen Klarheit des Filtrates filtriert, um die aus dem Leitungswasser stammende Schwefelsäure zu entfernen. Das Filtrat wird mit 10 ccm Bariumchlorid und 10 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt, bis zur Hälfte eingedampft, wieder 10 ccm Salzsäure hinzugefügt und bis auf etwa 30 ccm eingeengt, wobei sich Bariumsulfat ausscheidet, das man auf ein aschefreies Filter bringt, mit heißem Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion auswäscht, dann glüht und nach dem Erkalten wägt.

i) **Oxyproteinsäure** $C_{43}H_{82}N_{14}SO_{31}$.

Eigenschaften. Die Oxyproteinsäure ist in Wasser leicht löslich, ihr neutrales Bariumsalz ist in Wasser löslich, in Alkohol unlöslich, das basische Bariumsalz ist in Wasser unlöslich. Sie gibt weder die Xanthoprotein- noch die Biuretreaktion, ganz schwach die Millonsche Probe. Die Lösungen werden durch Phosphorwolframsäure und Sublimat nicht gefällt, aber durch Mercurinitrat.

Darstellung. Man engt den mit einer geringen Menge Alkohol versetzten Harn durch Destillation im Vakuum unter fortdauerndem Zufließen der zu destillierenden Flüssigkeit bis zu einem dünnen Sirup ein, den man mit verdünnter Schwefelsäure schwach ansäuert (Blaufärbung eines mit Kongorot getränkten Papierstreifens) und mit $1\frac{1}{2}$ Volumen Alkohol versetzt. Es scheiden sich dabei Alkalisulfate aus, die man abfiltriert, das Filtrat verdünnt man mit Wasser und fällt mit Barytwasser, wobei man den Barytüberschuß gleich darauf mit Kohlensäure fällt und von dem gesamten Barytniederschlag abfiltriert. Das Filtrat wird im Vakuum bis zur Sirupkonsistenz eingedampft, erkalten gelassen und nach dem Entfernen des dabei auskristallisierten Natriumchlorides mit starkem Alkohol gefällt. Der so erhaltene Niederschlag von Bariumsalzen wird nach dem Trocknen im Exsikkator in Wasser gelöst und mit Bleiessig gefällt. Der Bleiniederschlag enthält die Säuren der Alloxyproteinsäuregruppe, im Filtrate befindet sich die Antoxyproteinsäure und die mit Quecksilberazetat beim Neutralisieren fällbare Verbindung, die Oxyproteinsäure. Zu diesem Zweck wird das Blei mit Natriumkarbonat gefällt, das Filtrat vom Bleikarbonat mit Essigsäure neutralisiert, eingeengt und nach Entfernen der Alkalimetalle und Verjagen des Alkohols im Schwarzschen Apparate mit Äther extrahiert. Das mit Äther ausgezogene essigsäurefreie Säuregemisch wird in die Bariumsalze umgewandelt, die durch Fällung mit Alkohol in trockenem Zustande erhalten werden. Diese Bariumsalze werden in Wasser gelöst, die Lösung mit Essigsäure leicht angesäuert und mit einer 20 prozentigen Quecksilberazetatlösung versetzt, wobei ein reichlicher Niederschlag entsteht. Noch reichlicher wird aber die Fällung durch Neutralisieren des Filtrates; es werden abwechselnd bald die Lösung von Quecksilberazetat, bald eine Sodalösung so lange zugesetzt, wie ein weißer Niederschlag noch ausfiel; mit dem Ausfallen eines gelben Nieder-

schlages wird die Fällung unterbrochen. Dieser Niederschlag besteht zum größten Teil aus dem Quecksilbersalz der Oxyproteinsäure. Von den letzten Spuren der Antoxyproteinsäure lassen sich die Salze der Oxyproteinsäure durch Umfällen mit Quecksilberazetat befreien, und zwar, indem die ersten Fraktionen jeder Fällung verworfen werden und der Prozeß so lange wiederholt wird, bis die Präparate keine Diazo-reaktion mehr geben. Das so erhaltene reine Quecksilbersalz wird mit Schwefelwasserstoff zerlegt, die dadurch freigewordene Säure nach dem Verjagen des Schwefelwasserstoffs mit Äther ausgezogen und dann in das Barium- oder Silbersalz umgewandelt. (Bondzynski, Dombrowski und Panek)¹⁾.

Quantitative Bestimmung. Die Bestimmung der Oxyproteinsäurefraktion nach Ginsberg²⁾ wird in folgender Weise ausgeführt. Man fällt 1000 ccm Harn mit überschüssiger heißgesättigter Bariumhydroxydlösung, entfernt den Barytüberschuß mit Kohlensäure, filtriert einen aliquoten Teil, dampft auf dem Wasserbade bis zum dünnen Sirup ein, den man dann mit einem Gemisch von 1 Teil Äther und 2 Teilen Alkohol erschöpft. Die Extraktion geschieht in der Weise, daß man den Sirup mit dem zwanzigfachen Volumen des Äther-Alkoholgemisches 24 Stunden unter öfterem Umschütteln im verschlossenen Gefäß stehen läßt, die Flüssigkeit vom Rückstande dekantiert, diesen mehrmals mit Äther-Alkohol wäscht und dann in Wasser löst. Diese Fraktion enthält nur die Bariumsalze der drei Oxyproteinsäuren nebst geringen Mengen eines noch unbekannten stickstoffhaltigen Restes. Die Oxyproteinsäuren werden nach Sodazusatz mit Quecksilberazetat gefällt und ihr Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt.

Die von Gawinski³⁾ ausgearbeitete Methode zur Bestimmung der Proteinsäuren beruht auf der Unlöslichkeit der Bariumsalze dieser Säuren in absolutem Alkohol.

Man dampft den mit Essigsäure angesäuerten Harn im Vakuum bei 55° C bis zur Konsistenz eines dünnen Sirups ein, säuert diesen mit verdünnter Schwefelsäure schwach an, bis zur Blaufärbung eines mit Kongorot gefärbten Papierstreifens, und versetzt mit dem doppelten bis dreifachen Volumen starken Alkohols, wodurch sich die Alkalimetalle als Sulfate ausscheiden. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit 75 prozentigem Alkohol gewaschen. Das Filtrat, in dem die freien Proteinsäuren enthalten sind, wird mit 2—3 fachem Volumen Wasser verdünnt und mit Bariumhydrat versetzt, wobei ein Niederschlag von schwefelsaurem, phosphorsaurem und harnsaurem Barium entsteht,

¹⁾ St. Bondzynski und R. Gottlieb, Über einen bisher unbekannten normalen Harnbestandteil, die Oxyproteinsäure. Zentralbl. f. mediz. Wissensch. 35, 577 (1897). — St. Bondzynski, St. Dombrowski und K. Panek, Über die Gruppe von stickstoff- und schwefelhaltigen organischen Säuren, die im normalen Menschenharn enthalten sind. Zeitschr. f. physiol. Chemie 46, 83 (1905).

²⁾ W. Ginsberg, Über die Mengenverhältnisse und die physiolog. Bedeutung der Oxyproteinfraktion im Harn. Hofmeisters Beiträge 10, 411 (1907).

³⁾ W. Gawinski, Quantitative Untersuchungen über die Ausscheidung von Proteinsäuren im Harn usw. Zeitschr. f. physiol. Chemie 58, 454 (1908/9).

während die Bariumsalze der Proteinsäuren im Filtrate enthalten sind. Das Filtrat wird vom überschüssigen Baryt durch Einleiten von Kohlensäure befreit, im Vakuum bis zum dicken Sirup eingedampft und mit einem Gemisch von 2 Volumen 96 prozentigen Alkohols und 1 Volumen Äther übergossen, es bleibt auf dem Boden des Gefäßes ein schmieriger, dunkel gefärbter Rückstand zurück. Nach 24 stündigem Stehen wird die äther-alkoholische Lösung durch ein kleines Filter dekantiert, der Rückstand auf dem Filter und im Kolben in lauwarmem Wasser gelöst, die Lösung mit geglühtem Seesand verrieben und in kleinen Portionen in Hofmeisterschen Schalen bis zur Trockne eingedampft. Der Trockenrückstand wird im Mörtel fein zerrieben, im Soxhletapparate 3 bis 5 Stunden mit absolutem Alkohol extrahiert, hierauf mit lauwarmem Wasser ausgelaugt, die filtrierte Lösung auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt.

k) Antoxyproteinsäure.

Eigenschaften. Die Antoxyproteinsäure wird aus ihren konzentrierten Lösungen durch Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag, der anfangs flockig ist, sintert aber bald zu einer klebrigen Masse zusammen, ist im Überschuss des Fällungsmittels und in Wasser löslich. Die antoxyproteinsäuren Salze von Kalium und Natrium sind in Wasser sehr leicht löslich. Das Kalzium- und Bariumsalz stellen weiße Pulver dar, die in Wasser ebenfalls leicht löslich sind; in absolutem Alkohol ist das Bariumsalz sehr schwer, das Kalziumsalz etwas leichter löslich. Das Silbersalz löst sich leicht in Wasser, wird auf Zusatz von Alkohol als weißer, flockiger Niederschlag ausgefällt. Die Antoxyproteinsäure spaltet ihren Schwefel beim Kochen mit Alkalien ab. Sie ist optisch aktiv und dreht die Polarisationssebene ziemlich stark nach rechts. Sie gibt weder die Biuret- noch die Millonsche Reaktion, wohl aber die Ehrlichsche Reaktion mit Diazobenzolsulfosäure.

Darstellung. Der Harn wird auf folgende Weise vorbereitet. Nach der Entfernung der Phosphorsäure mit Kalk, der Schwefelsäure mit Barythydrat und dem Ausfällen des Kalk- und Barytüberschusses mit Kohlensäure wurde der Harn im Vakuum bei 55° C bis zu einem dünnen Sirup eingedampft, durch wechselndes Einengen und Erkaltenlassen und dabei erfolgende Ausscheidung von einem großen Teil Natriumchlorid, sowie teilweise von Harnstoff befreit und dann mit einem Alkohol-Äthergemisch (2:1) mehreremal ausgezogen; der in Alkohol-Äther unlösliche Rückstand wird in Wasser gelöst und zur Entfernung der Verbindungen der Alloxyproteinsäuregruppe mit Bleiessig gefällt. Das Filtrat wird dann zur Entfernung des Bleis mit Natriumkarbonat versetzt, die alkalische Flüssigkeit mit Essigsäure neutralisiert, eingengt, mit Essigsäure angesäuert und mit einer 20 prozentigen Lösung von Quecksilberazetat versetzt, so lange noch eine Fällung entsteht. Dieser bei saurer Reaktion ausgefallene Quecksilberniederschlag wird abgenutscht, in einem Porzellanmörtel mit Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion verrieben und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Quecksilbersulfid wird nach dem Verjagen des Schwefelwasserstoffs mittels eines Luftstromes noch einmal mit Quecksilberazetat in saurer Lösung gefällt. Der Niederschlag wird nach dem Auswaschen wieder mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat vom

Schwefelwasserstoff befreit, mit Bariumhydrat versetzt und nach dem Ausfällen des Barytüberschusses mit Kohlensäure und Einengen der Flüssigkeit im Vakuum bis zur Sirupkonsistenz mit starkem Alkohol versetzt, wobei ein Niederschlag des Bariumsalzes entsteht. Der Niederschlag wird durch wiederholtes Auflösen in Wasser und Umfällen mit Alkohol gereinigt und im Vakuumexsikkator getrocknet oder in das Silbersalz umgewandelt. Zu diesem Zwecke wird das Bariumsalz in der Lösung mit Natriumsulfat in das Natriumsalz übergeführt, jedoch unter Vermeidung des geringsten Überschusses von Natriumsulfat, dann wird zur Ausfällung des Chlors eine genügende Menge Silbernitrat hinzugefügt, das ausgeschiedene Chlorsilber abfiltriert und das Filtrat mit einem berechneten Überschuß von Silbernitrat und mit Alkohol im Verhältnis 1 : 1 versetzt. Das Silbersalz fällt als weißer flockiger Niederschlag, der anfangs mit 50prozentigem, darauf mit stärkerem und schließlich mit 97 prozentigem Alkohol ausgewaschen, vom Alkohol mit Äther befreit und im Vakuumexsikkator getrocknet wird.

Es gelingt, aus dem nach der hier beschriebenen Methode dargestellten Bariumsalz durch partielles Zerlegen mit einer zur vollständigen Ausfällung von Barium ungenügenden Menge verdünnter Schwefelsäure, Eindampfen der Lösung im Vakuum bis zur Sirupkonsistenz, Ausziehen der freien Säure mit absolutem Alkohol und Versetzen mit Baryt ein von alloxyproteinsaurem Barium vollständig freies Bariumsalz der Antoxyproteinsäure zu erhalten.

1) Alloxyproteinsäure.

Eigenschaften. Die freie Alloxyproteinsäure ist sowohl in Wasser wie in starkem Alkohol leicht löslich und wird aus der alkoholischen Lösung auch mit Äther nicht gefällt. Die Säure ist schwefelhaltig. Die alloxyproteinsauren Salze unterscheiden sich von den oxy- und antoxyproteinsauren Salzen durch ihre geringere Löslichkeit in Alkohol, ferner dadurch, daß die Lösung des Bariumsalzes optisch inaktiv ist und daß sie mit Eisenchlorid nicht gefällt wird.

Darstellung. Als Ausgangsmaterial zur Darstellung der Alloxyproteinsäure dienen die Bleiniederschläge, die bei der Gewinnung von Antoxyproteinsäure, sowie von Oxyproteinsäure von dem diese Säuren enthaltenden Filtrate getrennt werden. Der Bleiniederschlag wird nach dem Auswaschen in zwei nacheinander folgenden Operationen anfangs mit einer sehr verdünnten Lösung von Oxalsäure dann mit einem Überschuß dieser Säure unter stetem Umrühren mittels eines Rührwerkes behandelt. Die bei diesen Zersetzungsprozessen erhaltenen Filtrate werden durch Binden der freien Säure mit Kalkhydrat, Entfernen des Kalküberschusses mit Kohlensäure, Einengen bei gelinder Wärme im Vakuum und Fällen mit Alkohol auf das Kalziumsalz der Säure verarbeitet. Die zweiten größeren Fraktionen enthalten nach Umfällung mit Alkohol und Ausziehen mit Alkohol nur Kalziumsalze von mit Bleiessig fällbaren Verbindungen. Durch Zerlegen mit Oxalsäure, Filtrieren vom oxalsauren Kalk, Ausfällen des Oxalsäureüberschusses mit Barythydrat, Entfernen des Barytüberschusses mit Kohlensäure und Fällen

des eingedampften Filtrates mit starkem Alkohol wird das Kalziumsalz in das Bariumsalz umgewandelt.

m) Uroferrinsäure $C_{35}H_{56}N_8SO_{19}$.

Eigenschaften. Die Uroferrinsäure stellt ein weißes Pulver dar, das in Wasser, gesättigter Ammoniumsulfatlösung und Methylalkohol leicht löslich, in absolutem Alkohol schwer löslich, in Benzol, Äther, Chloroform und Essigäther unlöslich ist. Ihr spezifisches Drehungsvermögen ist $(\alpha)_D^{18} = -32,5^\circ \text{ C}$. Sie gibt weder die Biurettreaktion noch die Reaktion von Millon oder Adamkiewitsch. Beim Sieden mit Salzsäure wird die Hälfte des Schwefels als Schwefelsäure abgespalten. Als Spaltungsprodukte wurden Melaninsubstanzen, organische schwefelhaltige Verbindungen, Schwefelwasserstoff und Asparaginsäure nachgewiesen.

Darstellung (Thiele) ¹⁾. 1500 Liter Harn werden unter Zusatz von Ammoniak und Chloroform oder Thymol bei 40—50 ° C auf dem Wasserbade auf 60 Liter konzentriert, der Sirup portionsweise mit 80 Liter 90 prozentigen Alkohols 3 Stunden lang durchgerührt, abgesaugt und der Niederschlag nochmals mit der doppelten Menge seines Gewichtes an 60 prozentigem Alkohol ausgezogen. Der Alkohol wird größtenteils verjagt, das mit Schwefelsäure genau neutralisierte Extrakt nach dem Verdünnen mit Eisenammoniumalaun ausgefällt, das Filtrat mit ungefähr 100 kg Ammoniumsulfat gesättigt und mit ebenfalls ammoniumsulfathaltigem Eisenalaun aufs neue gefällt. Der chlorfrei gewaschene Niederschlag wird in verdünnter Schwefelsäure gelöst, durch Ammoniak in gelinder Wärme vom Eisen befreit, die 70 Liter betragenden Filtrate und Waschwässer nach Neutralisation mit etwa 50 kg Ammoniumsulfat gesättigt, worauf durch Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure eine schmierige Substanz ausfällt. Der darauf bei schwach saurer Reaktion mittels ammoniumsulfatgesättigter Eisenammoniakalaunlösung wieder gefällte Niederschlag wird nach dem Auswaschen mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung mit der erforderlichen Menge 50 prozentiger Schwefelsäure durchgerührt, die Lösung zweimal mit 96 prozentigem Alkohol (1:2) ausgeschüttelt, der Alkoholextrakt mit Ammoniak versetzt, wodurch größtenteils Ammoniumsulfat ausfällt, endlich das Filtrat im Vakuum vom Alkohol befreit. Die vorhandenen Eisenmengen werden durch Barytwasser und Kohlensäure zum größten Teil entfernt, die Flüssigkeit im Vakuum auf 250 ccm eingeeengt, mit dem zehnten Teil ihres Gewichtes an Eisessig versetzt und in 10 Liter absoluten Alkohol tropfen gelassen, wodurch 30 g einer Substanz Z mit 1,5 Proz. Asche (Fe_2O_3) erhalten werden. Durch Methylalkohol wird diese Substanz in einen löslichen Y und einen unlöslichen Anteil getrennt. Die Lösung wird durch Äther gefällt, die alkoholätherischen Mutterlaugen verdampft, mit Ammoniak neutralisiert und mit Bleiazetat gefällt, der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, die Flüssigkeit eingeeengt und wieder mit Alkohol-Äther gefällt: Fraktion X. Alle Fraktionen haben nach Abzug der Asche die gleiche Zusammensetzung $C_{35}H_{56}N_8SO_{19}$, die bei Umfällung sich nicht ändert.

¹⁾O. Thiele, Über Uroferrinsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**, 251 (1902/3).

25. Anorganische Bestandteile.

a) Chloride.

Die quantitative Bestimmung des Chlors im Harn geschieht gewichtsanalytisch durch Fällern oder am einfachsten durch Titration mit Silbernitratlösung, wobei anwesendes Eiweiß, sowie Jod- bzw. Bromverbindungen entfernt werden müssen.

Gewichtsanalytisch verfährt man so, daß man 5—10 ccm Harn in einer Platinschale unter Zusatz von reinem Natriumkarbonat oder von einem Gemisch aus 1 Teil Natriumkarbonat und 2 Teilen chlorfreiem Salpeter auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft. Die Einäschernng des Harnes muß aus dem Grunde vorgenommen werden, weil beim direkten Versetzen mit dem Silbersalz auch organische Harnbestandteile mit ausfallen und so den Chlorgehalt etwas erhöhen können. Der Rückstand wird vorsichtig eingeäschert, die Schmelze mit heißem Wasser, dem einige Tropfen Salpetersäure zugesetzt werden, bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion unter gleichzeitiger Filtration extrahiert. Der wässrige Extrakt wird eingengt und kalt mit Salpetersäure behandelt, bis alle Kohlensäure entwichen ist, dann mit einer Silbernitratlösung versetzt, so lange ein flockiger Niederschlag entsteht, zum Sieden erhitzt und nach dem Absetzen des Niederschlages durch einen mit Asbest beschickten Goochtiiegel filtriert, mit salpetersäurehaltigem kalten Wasser gewaschen, bei 130° C getrocknet und gewogen.

Bei der maßanalytischen Bestimmung wird der Harn in derselben Weise behandelt wie bei der gewichtsanalytischen, nur wird die salpetersaure Aschenlösung mit reinem kohlensauren Kalk neutralisiert (ein geringer Überschuß beeinträchtigt nicht die Reaktion), mit einigen Tropfen einer kaltgesättigten Lösung von chromsaurem Kalium versetzt und mit Silberlösung titriert, bis eine deutlich rötliche Färbung auch nach dem Umrühren bestehen bleibt und ein braunroter Niederschlag von Silberchromat sich ausgeschieden hat. Die Silbernitratlösung muß 18,469 g Silber im Liter enthalten, so daß ein Kubikzentimeter 10 mg Chlornatrium oder 6,068 mg Chlor entspricht.

Die von Volhard vorgeschlagene Methode ermöglicht eine genauere Bestimmung. Sie beruht darauf, daß man aus dem mit Salpetersäure ausgesäuertem Harn die Salzsäure mit Silbernitrat im Überschuß ausfällt, filtriert und das überschüssig zugesetzte Silbernitrat mit einer Lösung von Rhodankalium unter Zusatz von Eisensalaun als Indikator zurücktitriert, wobei eine Rotbraunfärbung unter Bildung von Rhodaneisen das Ende der Reaktion anzeigt.

Man versetzt in einem mit einer Marke versehenen 100 ccm fassenden Kolben 10 ccm Harn mit 5 ccm chlorfreier Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,2, fügt 50 ccm Wasser und 20 ccm $\frac{1}{10}$ -Normal-silbernitratlösung hinzu, schließt den Kolben mit dem Glasstopfen, schüttelt gut um, spritzt den Stopfen sorgfältig mit destilliertem Wasser ab, füllt mit destilliertem Wasser bis zur Marke auf und filtriert durch

ein trocknes Filter. 50 ccm des Filtrates werden nun mit 3 ccm einer bei Zimmertemperatur gesättigten Lösung von chlorfreiem Eisenaun versetzt und der Überschuß an Silbernitrat mit $\frac{1}{10}$ -Normalrhodankaliumlösung zurücktitriert, bis die über dem Niederschlage stehende Flüssigkeit eine Rotfärbung angenommen hat.

Sind für die 50 ccm Filtrat 5 ccm Rhodanlösung verbraucht worden, so würden 100 ccm Filtrat = 10 ccm Harn 10 ccm Rhodan nötig haben. Es sind aber 20 ccm $\frac{1}{10}$ -Silberlösung angewendet worden, so daß zur vollständigen Ausfällung der Chloride in 10 ccm Harn 10 ccm Silberlösung = 0,0585 g NaCl erforderlich waren.

Man löst etwa 19 g Rhodankalium in destilliertem Wasser zum Liter auf.

Den Titer der Rhodankaliumlösung stellt man mit der Silbernitratlösung in folgender Weise fest. 10 ccm der Silbernitratlösung werden mit 5 ccm Salpetersäure und 1—2 ccm der Eisenaunlösung versetzt und mit Wasser zu 100 ccm verdünnt. Zu diesem Gemisch läßt man nun aus der Bürette Rhodankalium langsam bis zum Eintritt einer nicht verschwindenden Rotfärbung zufließen. 10 ccm der Rhodanlösung müssen 10 ccm der Silberlösung entsprechen; ist die Lösung stärker, so muß sie entsprechend mit Wasser verdünnt werden.

Sind Bromide oder Jodide vorhanden, dampft man eine bestimmte Menge Harn mit dem Gemisch aus Soda und Salpeter bis zur Trockne ein, verascht den Rückstand, löst die Schmelze in Wasser, versetzt die so erhaltene Lösung mit verdünnter Schwefelsäure und etwas Nitrit und schüttelt das so ausgeschiedene Jod oder Brom mit Schwefelkohlenstoff aus. In dem Filtrat bestimmt man nun die Menge der Chloride nach der Volhardschen Methode, während der Gehalt an Bromiden oder Jodiden als Differenz aus der Menge Silbernitratlösung sich berechnen läßt, die zur Titration der Lösung der Schmelze einerseits und des entsprechenden Volumens des ursprünglichen Harnes andererseits verbraucht worden ist.

b) Bromide.

Nachweis. Zum Nachweis von Brom im Harn verfährt man nach Salkowski¹⁾ in der Weise, daß man 10 ccm Harn mit 1 Tropfen Sodalösung alkalisch macht, auf dem Wasserbade bis zur Trockne verdampft und den Rückstand mit kleiner Flanne verkohlt. Die Kohle zieht man mit heißem Wasser aus, versetzt die Lösung mit Chlorwasser und Salzsäure und schüttelt mit Chloroform oder Schwefelkohlenstoff aus; in Gegenwart von Brom färbt sich das Lösungsmittel gelbbraun. Wäscht man nun die Chloroformschicht mehrmals mit Wasser aus und versetzt sie mit wässriger Jodkaliumlösung, so macht das Brom dann Jod frei, und das Chloroform färbt sich rot oder rotviolett.

Brom neben Jod weist man nach Jolles nach, indem man 10 ccm Harn in einem enghalsigen Kölbchen mit Schwefelsäure ansäuert, mit Permanganatlösung bis zur Rotfärbung versetzt, in den Hals des Kölbchens einen mit einer p-Dimethylphenylendiaminlösung angefeuchteten Papierstreifen einschiebt und auf dem Wasserbade erwärmt, wobei auf dem Papier die charakteristische Bromfärbung entsteht. Die entsprechende Jodreaktion ist bedeutend schwächer und ruft einen gelbbraunen Ring hervor, so daß man Spuren von Brom neben größeren

¹⁾ E. Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 157 (1903).

Jodmengen mit Sicherheit nachweisen kann, z. B. 0,001 g Bromnatrium in 100 ccm Harn.

c) Jodide.

Nachweis. Direkt im Harn weist man Jod nach, indem man den Harn mit einigen Tropfen einer verdünnten Kalium- oder Natriumnitritlösung und einigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure versetzt, dann etwas Chloroform oder Schwefelkohlenstoff, auch Bromwasser hinzufügt und durchschüttelt. Das dabei freiwerdende Jod färbt das Lösungsmittel rot bis rotviolett. Statt eines Lösungsmittels fügt man dem Harn einige Tropfen Stärkelösung hinzu, die sich in Gegenwart von freiem Jod blau färbt.

Bei geringen Mengen Jod empfiehlt es sich, eine größere mit Soda alkalisch gemachte Harnportion in einer Nickelschale auf dem Wasserbade zur Trockne einzudampfen, den Rückstand vorsichtig mit kleiner Flamme zu verkohlen, die Kohle mit heißem Wasser zu extrahieren und zu filtrieren. Das Filtrat wird mit reiner rauchender Salpetersäure angesäuert und mit Chloroform oder Schwefelkohlenstoff geschüttelt, wobei die rotviolette Färbung auftritt.

Jod neben Brom kann man nachweisen, wenn man zuerst auf Jod prüft und dann so viel Eisenchlorid hinzufügt, daß alles Jod in Freiheit gesetzt wird, auf dem Wasserbade zur Trockne eindampft und den Rückstand noch 1—2 Stunden erhitzt, um das frei gewordene Jod zu verjagen. Den Rückstand, der die Bromwasserstoffsäure enthält, nimmt man mit Wasser auf, fällt das Eisen durch Versetzen mit Soda, übersättigt das Filtrat mit Salzsäure, fügt Chlorwasser zu und schüttelt mit Schwefelkohlenstoff.

Quantitative Bestimmung von Jod.

Methode von R. Rösler ¹⁾. Man versetzt 50 ccm Harn mit einem Überschuß von kohlensaurem Ammonium, verdampft auf dem Wasserbade zur Trockne, verkohlt den Rückstand mit kleiner Flamme, spült die Kohle in eine tubulierte Retorte, destilliert mit einer 10 prozentigen Eisenchloridlösung auf dem Sandbade und fängt das Destillat in einer vorgelegten Jodkaliumlösung auf. Die erhaltene Jod-Jodkaliumlösung wird mit $\frac{1}{10}$ -Normalnatriumthiosulfat unter Benutzung von Stärke als Indikator titriert.

Methode von Lassaigne-Hilger ²⁾. 10—20 ccm Palladiumchlorürlösung (10 ccm dieser Lösung entsprechen 0,0119 g Jod), je nach dem Jodgehalt des zu untersuchenden Harnes, erhitzt man in einem Glaskolben mit eingeschliffenem Glasstöpsel im Wasserbade und setzt so viel von dem mit Salzsäure angesäuerten und auf ein bestimmtes Volumenaufgefüllten Harn hinzu, bis sämtliches Palladium als Jodür abgeschieden ist. Kleine filtrierte Proben, mit einigen Tropfen Harn versetzt, zeigen an, ob die Flüssigkeit sich wieder trübt oder klar bleibt, d. h. ob die Reaktion beendet ist oder nicht. Die Titerstellung der Palladiumchlorürlösung geschieht mittels einer Jodkaliumlösung, von der 1 ccm = 1 mg Jod, bereitet durch Auflösen von 1,308 geglühtem reinen Jodkalium im Liter Wasser.

Nach Pecirka ³⁾ (Modifikation der Hilgerschen Methode) verfährt man in der Weise, daß man 50 ccm Harn mit 0,5 g Salpeter (5 ccm einer 10 prozentigen Lösung und 5 ccm einer Normalsodalösung) in

¹⁾ R. Rösler, Pflügers Archiv 77, 22.

²⁾ Hilger, Über die quantitative Bestimmung von Jod im Harn. Lieb. Annalen 171, 212.

³⁾ J. Pecirka, Über die Bestimmung des Jods im Harn nach Kersting. Zeitschr. f. physiol. Chemie 7, 491.

einer Platinschale eindampft, den Trockenrückstand verascht, mit 5 ccm einer 10 prozentigen Natronlauge versetzt und in der nötigen Menge Wasser löst. In die Lösung legt man Zinkstäbchen von einigen Zentimetern Länge, läßt die Flüssigkeit eine Stunde in der Wärme, gießt sie in einen 100 ccm-Meßkolben, spült Schale und Zinkstab nach, versetzt mit etwas Stärkelösung und säuert mit verdünnter Schwefelsäure (1:4) an. Wird die Flüssigkeit dabei nur schwach blau, so kann man sie sofort zum Titrieren verwenden, ist sie dagegen stark blau oder grün, oder braun, so muß die überschüssig vorhandene salpetrige Säure entfernt und das Jod wieder in Jodwasserstoffsäure übergeführt werden. Man fügt nun tropfenweise eine Natriumbisulfitlösung hinzu, leitet in die Flüssigkeit einen lebhaften Strom von Kohlensäure, weil die salpetrige Säure durch die schweflige Säure zu Stickoxyd reduziert wird, dieses in der Flüssigkeit gelöst bleibt und sich, sobald die Flüssigkeit wieder mit Luft in Berührung kommt, wieder zu salpetriger Säure oxydiert. Hat man einen Überschuß an schwefliger Säure hinzugefügt, so entfernt man diesen unter Einleiten von Kohlensäure wieder durch tropfenweisen Zusatz einer verdünnten Lösung von salpetrigsaurem Natrium. Man ist sicher, weder schweflige Säure in der Flüssigkeit zu haben, durch welche das Palladiumchlorür reduziert werden würde, noch salpetrige Säure, wenn die Flüssigkeit schwach blau ist. Das Filtrat verwendet man zur Titration.

d) Phosphate.

Nachweis. Man versetzt den zu prüfenden Harn mit Essigsäure und Uranazetatlösung; es entsteht in Gegenwart von Phosphorsäure ein gelblichweißer Niederschlag. Zum getrennten Nachweis der an alkalische Erden und Alkalien gebundenen Phosphorsäure versetzt man den Harn mit Ammoniak, wodurch Kalziumphosphat und Magnesiumammoniumphosphat ausfallen; versetzt man deren salpetersaure Lösung mit Ammoniummolybdat, so scheidet sich ein gelber kristallinischer Niederschlag von Ammoniumphosphormolybdat aus. Im eingedampften Filtrate weist man die Alkaliphosphate durch Fällen mit Magnesiamixtur nach.

Die quantitative Bestimmung der Phosphorsäure geschieht nach verschiedenen Methoden. Die Gesamtphosphorsäure bestimmt man nach dem alkalimetrischen Verfahren von Neumann nach vorhergehender Oxydation (Veraschung) des Harnes mit einem Gemisch gleicher Volumteile konzentrierter Schwefelsäure und Salpetersäure (s. S. 111), ferner in der reinen Harnasche durch Fällen mit Ammoniummolybdat und dann mit Magnesiamixtur und endlich durch Titration mit Uranazetat. Die genauesten Werte erhält man nach den beiden ersten Methoden, nach der letzten, deren Ausführung weniger Zeit in Anspruch nimmt, erhält man hinreichend genaue Resultate.

- Das Prinzip der Titrierung mit Uranazetat ist folgendes. Uranazetat gibt mit phosphorsauren Verbindungen in warmer essigsaurer Lösung einen weißgelben oder grünlichgelben, flockigen Niederschlag von phosphorsaurem Uranoxyd von der Zusammensetzung $(\text{UO}_2)\text{HPO}_4$. Dieser Niederschlag ist unlöslich in Essigsäure, wird aber von Mineral-

säuren gelöst, und deshalb setzt man bei der Titrierung immer Natriumazetatlösung in bestimmter Menge zu. Als Indikator wendet man Ferrozyankaliumlösung an, die in sauren Uranlösungen selbst bei außerordentlicher Verdünnung noch deutlich wahrnehmbaren dunkelbraunen Niederschlag oder Koschenilletinktur, die einen grünen gibt.

Erforderliche Lösungen. Die zur Titrierung erforderliche Uranlösung, die im Liter 20,3 g eines Uranoxydsalzes enthalten muß, deren 1 ccm also 0,005 g P_2O_5 entspricht, stellt man aus Urannitrat oder Uranazetat dar. Man löst etwa 35 g essigsäures Uranoxyd in Wasser, setzt etwas Essigsäure bis zur vollständigen Lösung hinzu und verdünnt zum Liter. Den Gehalt der Lösung ermittelt man durch Titration mit einer Natriumphosphatlösung von 10,085 g kristallisiertem Salz im Liter, was einem Gehalte von 0,100 g P_2O_5 in 50 ccm gleich ist. Man verfährt in derselben Weise wie beim Titrieren im Harne (s. unten), verdünnt die Lösung mit Wasser, titriert wieder, bis 20 ccm der Uranlösung genau 50 ccm der obigen Phosphatlösung entsprechen.

Zur Darstellung der Essigsäuremischung löst man 100 g kristallisiertes Natriumazetat und 100 g Eisessig in destilliertem Wasser zum Liter auf. Zu jeder Titrierung nimmt man von dieser Lösung 5 ccm auf 50 ccm Harn.

Man erwärmt 50 ccm enteiweißten Harn und 5 ccm der Essigsäuremischung in einem Becherglase auf dem Wasserbade und titriert die heiße Flüssigkeit mit der Uranlösung unter Benutzung von Ferrozyankalium als Indikator, bis ein mit dem Glasstabe herausgenommener Tropfen der Flüssigkeit sich mit einem Tropfen des Indikaturs rotbraun färbt. Die Endreaktion beruht darauf, daß der erste Tropfen überschüssiger Uranlösung mit Ferrozyankalium eine Braunfärbung gibt, während das gefällte Uranphosphat keine Färbung liefert. Man kann auch als Indikator Koschenilletinktur benutzen. In diesem Falle läßt man so lange unter Umschütteln und Erwärmen Uranlösung zufließen, bis die rote Farbe in eine grünlche umschlägt. Die Koschenilletinktur wird in der Weise bereitet, daß man 2 g Koschenillekörnchen mit 200 g Wasser und 50 g Alkohol 2 Stunden digerieren läßt und dann filtriert.

Bei der Bestimmung der an Alkalien und alkalische Erden gebundenen Phosphorsäure verfährt man in der Weise, daß man zuerst die Gesamtmenge der Phosphorsäure im Harne bestimmt, dann in einer anderen Harnportion durch Versetzen mit Ammoniak die Erdphosphate ausfällt. Der Niederschlag wird auf einem Filter gesammelt, ausgewaschen, in ein Becherglas mit Wasser quantitativ übergespült, mit Essigsäure versetzt und erwärmt, wodurch Lösung eintritt. Diese Lösung verdünnt man mit Wasser zu 50 ccm, fügt 5 ccm Natriumazetatlösung hinzu und titriert wie gewöhnlich mit Uranlösung. Die Differenz der in beiden Bestimmungen ermittelten Phosphorsäuremengen gibt die Menge der an Alkalien gebundenen Phosphorsäure an.

Bestimmung von Phosphorsäure und organisch gebundener Phosphorsäure nebeneinander. In einer Portion wird gewichtsanalytisch nach dem Veraschen mit Kali und Salpeter oder nach Neumann bestimmt. Eine zweite Portion Harn wird zum Ausfällen der Phosphate mit ammoniakalischer Chlorkalziumlösung versetzt, der Niederschlag abfiltriert und gut ausgewaschen. Das Filtrat samt dem Waschwasser dampft man ein, verascht den Rückstand mit dem Salpetergemisch oder nach Neumann und bestimmt die Phosphorsäure. Die so erhaltene Phosphorsäure stellt die organisch gebundene dar.

e) Nitrate.

Nachweis. Zum Nachweis der Nitrate versetzt man 250 ccm frischen Harn mit 25—30 ccm reiner konzentrierter Schwefelsäure oder Salzsäure, destil-

liert auf dem Sandbade durch einen Kühler in eine Vorlage bis zu $\frac{1}{3}$ des Volumens und prüft das Destillat mit den folgenden Reaktionen auf salpetrige Säure, die durch die reduzierend wirkenden organischen Harnsubstanzen aus Salpetersäure entstanden ist.

Reaktion von Grieß. Versetzt man einen aliquoten Teil des Destillates mit einer wässrigen Lösung von schwefelsaurer Diaminobenzoesäure, so färbt sich die Flüssigkeit gelb bis orangerot, und bei Gegenwart größerer Mengen salpetriger Säure scheidet sich ein amorpher braunroter Niederschlag aus.

Reaktion von Kopp. Einige Tropfen einer Lösung von 0,1 g Diphenylamin im Liter konzentrierter Schwefelsäure rufen in einer Nitritlösung Blaufärbung hervor.

Lungo führt diese Probe aus, indem er einige Kubikzentimeter einer Lösung von 0,5 g Diphenylamin in 100 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 20 ccm Wasser mit dem zu prüfenden Harn überschichtet, wobei an der Berührungsstelle ein blauer Ring entsteht.

Reaktion mit Fuchsin. Eine essigsäure Fuchsinlösung wird von salpetriger Säure violett, dann blau, grün und schließlich gelb gefärbt.

Reaktion mit Sulfanilsäure und α -Naphthylamin. Versetzt man eine schwach saure Lösung eines Nitrits sukzessive mit je 1 Tropfen wässriger Sulfanilsäure, Salzsäure und salzsaurem Naphthylamin, so entsteht eine Rotfärbung durch Bildung von Azobenzolnaphthylaminsulfosäure.

Direkte Probe für Salpetersäure. Schichtet man eine Mischung einer wässrigen Nitratlösung mit einer wässrigen Bruzinlösung über konzentrierte Schwefelsäure, so bildet sich in Gegenwart von Salpetersäure eine rosarote, am unteren Rande gelbe Zone.

Die salpetrige Säure wird direkt im Harn mit einer der oben angeführten Reaktionen nachgewiesen.

Quantitative Bestimmung. Bestimmung der Salpetersäure als Stickoxyd nach Schlösing¹⁾ und Grandeau (modifiziert von Tiemann und Schulze)²⁾. Nach Tiemann und Schulze verfährt man in der Weise, daß man den Harn in einem 200 ccm fassenden Kolben auf ein kleines Volumen eindampft, die darin enthaltene Salpetersäure durch Eisenchlorür und konzentrierte Salzsäure in Stickoxyd verwandelt, dieses über ausgekochter Natronlauge auffängt und aus dem Volumen desselben die entsprechende Menge von Milligrammen N_2O_5 berechnet.

Um das Schäumen beim Kaninchen- und Menschenharn zu vermeiden, modifizierte Röhm³⁾ das Schulzesche Verfahren dadurch, daß er den Harn zuerst mit Natronlauge neutralisiert, auf dem Wasserbade bei stets alkalischer Reaktion bis zum dünnen Sirup eindampft, mit $\frac{3}{4}$ seines Volumens 96 prozentigen Alkohols versetzt und 24 Stunden stehen läßt. Hierauf filtriert man durch ein Faltenfilter, dampft den Alkohol ab, spült den alkoholischen Extrakt mit etwa 90 ccm Wasser in den Zersetzungskolben und dampft die Flüssigkeit im Kolben auf einem Drahtnetz auf 15 ccm ein und verfährt weiter wie unten angegeben.

Weyl und Meyer⁴⁾ haben die Alkoholextraktion dadurch vereinfacht, daß sie den 300 ccm frischen Harn mit 30—40 ccm einer basischen Bleiazetatlösung versetzen, gut durchschütteln, nach 24 stün-

¹⁾ Schlösing, Annal. de chim. et de phys. (3), **40**, 479 (1853).

²⁾ Tiemann und Schulze, Zeitschr. f. anal. Chem. **9**, 401 (1870); Chem. Ber. **6**, 1041 (1873).

³⁾ J. Röhm, Über die Ausscheidung von Salpetersäure und salpetriger Säure. Zeitschr. f. physiol. Chemie **5**, 231 (1881).

⁴⁾ T. Weyl und A. Meyer, Pflügers Archiv **36**, 456 (1881).

digem Stehen filtrieren, den Niederschlag mit kaltem Wasser auswaschen, das Filtrat auf dem Wasserbade unter Zusatz einiger Kristalle Glaubersalz bis auf etwa 50 ccm eindampfen. Reagiert das Filtrat nicht alkalisch, so wird es mit Natronlauge versetzt und nach dem Erkalten durch ein Faltenfilter in den Zersetzungskolben filtriert, und man verfährt wie S. 328 angegeben ist.

Methode von Pfeiffer und Thurmann ¹⁾. 50 ccm Harn versetzt man mit 10 g Natriumhydroxyd und erhitzt im Trockenschrank 8 Stunden auf 120—130°. Nach dem Erkalten wird der Flascheninhalt in einen Destillationskolben gegossen und der fest an der Flaschenwandung haftende Belag auf ein Filter gespült, der Niederschlag ausgewaschen, getrocknet und zurückgestellt. Inzwischen wird das Filtrat mit Natriumhydroxyd versetzt und so lange gekocht, bis kein Ammoniak mehr entweicht, erkennbar an einem befeuchteten roten Lackmuspapierstreifen. Hierauf wird der getrocknete Niederschlag dem Kolbeninhalt wieder zugesetzt, das Filter mit etwas Essigsäure und Wasser zur Gewinnung etwaiger noch am Papier haftender Spuren von Nitraten ausgewaschen und die Reduktion der Salpetersäure zu Ammoniak mit Zink und Eisen bewirkt. Das Ammoniak destilliert man ab, fängt es in einer mit einer gemessenen Menge titrierter Säure beschickten Vorlage auf und titriert den Überschuß mit Lauge zurück. 1 Gewichtsteil Ammoniak entspricht 3,117 Gewichtsteilen Salpetersäure.

f) Ammoniak.

Nachweis. Um Ammoniak nachzuweisen, versetzt man den Harn in einem Kolben mit Kalkmilch, befestigt an dem Stopfen einen Streifen roten Lackmuspapiers und verschließt den Kolben — bei Gegenwart von Ammoniak wird das Lackmuspapier blau gefärbt; oder wird ein mit verdünnter Salzsäure befeuchteter Glasstab über die Öffnung des Kolbens gehalten, so entwickeln sich am Glasstabe weiße Nebel von Chlorammonium.

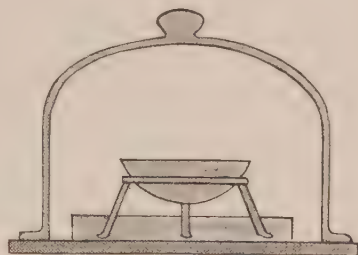


Fig. 39.

Quantitative Bestimmung.

Die quantitative Bestimmung des Ammoniaks geschieht nach folgenden Methoden:

Ammoniakbestimmung nach Schlösing.

Der dazu nötige Apparat besteht aus einer flachen Glasschale, in der auf einem gläsernen Dreifuß eine kleine Porzellanschale steht. Das Ganze steht auf einer Glasplatte und ist mit einer auf dieser ruhenden luftdicht schließenden Glasglocke bedeckt (Fig. 39). In die kleine Porzellanschale bringt man nun 50 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalschwefelsäure oder $\frac{1}{10}$ -Normaloxalsäure, in die Glasschale darunter 50 ccm des zu untersuchenden Harns. Dann läßt man zu dem Harn 30 ccm Kalkmilch zufließen, schließt

¹⁾ Th. Pfeiffer und H. Thurmann, Über die Bestimmung des Nitrastickstoffs neben dem organischen Stickstoff. Landwirtschaftliche Versuchstationen 46, 6 (1896).

schnell die Glocke und läßt nun 3—4 Tage ruhig stehen. Die Kalkmilch (eine Aufschwemmung vom Kalziumhydroxyd $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in Wasser) macht aus den im Harn enthaltenen Ammoniumsalzen das Ammoniak frei, das dann von der Schwefelsäure absorbiert wird. Nach dreitägigem Stehen nimmt man die Porzellanschale heraus und titriert ihren Inhalt mit $\frac{1}{10}$ -Normalnatronlauge. Auf diese Weise findet man leicht, wieviel ccm Schwefelsäure nötig waren, um das Ammoniak zu binden. Hat man z. B. 27 ccm NaOH nötig, um die Schwefelsäure zu neutralisieren, so waren $50 - 27 = 23$ ccm schon an Ammoniak gebunden. Nun entspricht 1 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalschwefelsäure 0,0014 g Stickstoff oder 0,0017 g NH_3 . Man braucht also nur die gefundene Schwefelsäurezahl mit diesen Konstanten zu multiplizieren, um den N- bzw. NH_3 -Gehalt des Harns zu finden. Der NH_3 -Gehalt des normalen Harns ist ungefähr 0,08—0,1 Proz.

Methode von Nencki und Zaleski¹⁾.

Man bringt in das Gefäß A (Fig. 40) 20—30 ccm Harn, in das Gefäß B 20 ccm einer $\frac{1}{5}$ -Normalschwefelsäure, verbindet die einzelnen

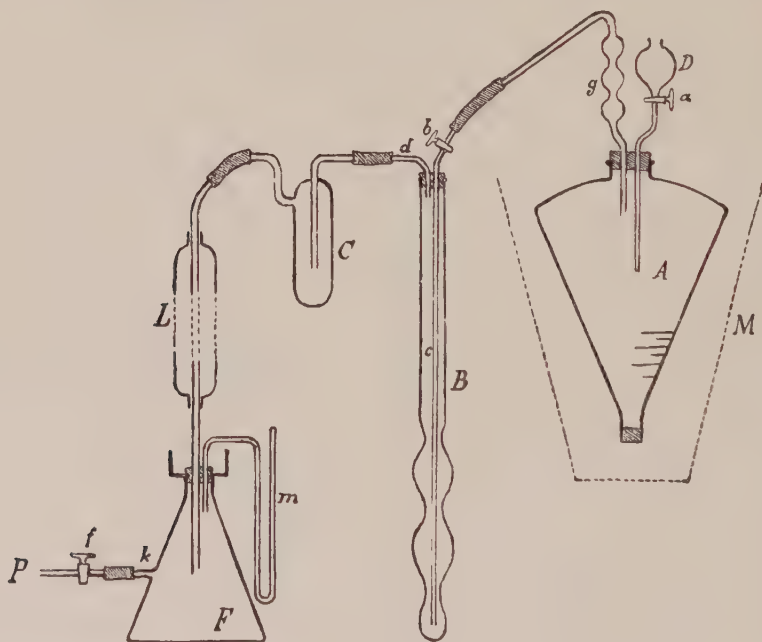


Fig. 40.

Teile des Apparates und evakuiert die Luft. Der Hahn a wird geschlossen, der Hahn b anfangs halb geöffnet, damit die rasch auf-

¹⁾ M. Nencki und J. Zaleski, Über die Bestimmung des Ammoniaks in tierischen Flüssigkeiten und Geweben. Zeitschr. f. physiol. Chemie **33**, 191 (1901).

steigenden Luftblasen in den Rezipienten B nicht hindurchgerissen werden; später wird er ganz geöffnet. Während des Evakuierens werden die Gummistopfen in den Gefäßen A und B, sowie eventuell die Kautschukverbindungen mit Paraffin luftdicht gemacht. Man läßt Wasser durch den Kühler fließen, und auch das Reservoir F wird durch Schnee oder kaltes Wasser gekühlt. Zeigt das Manometer einen Druck von 15—10 mm und passieren die Gasblasen durch den Rezipienten B langsam, so wird der Hahn b geschlossen und durch den Scheidetrichter D 50 ccm der 2 prozentigen Magnesiaemulsion hinzugefügt. Jetzt wird der Hahn b wieder geöffnet, und sobald die Gasentwicklung nachgelassen hat, erwärmt man das Wasserbad M. Die Steigerung der Temperatur muß sehr langsam geschehen, 2—4 Stunden, bis sie 35° erreicht hat, und die ganze Zeit auf 35—37° gehalten werden. Sind etwa $\frac{2}{3}$ des Inhaltes aus dem Gefäße A überdestilliert, in etwa 5—6 Stunden, so kann die Destillation als beendet betrachtet werden. Zu-

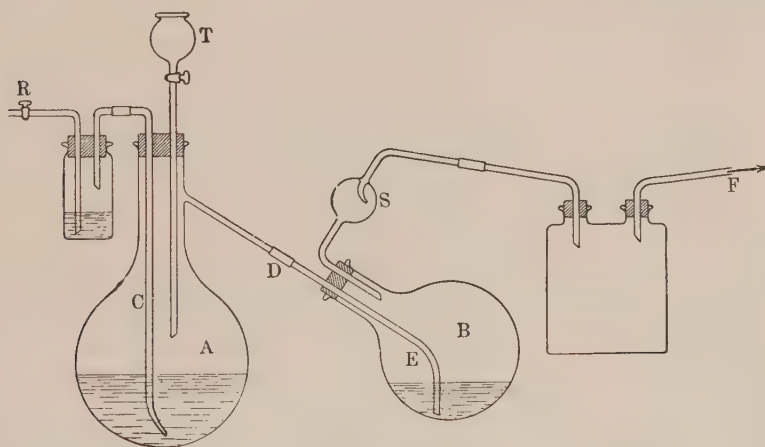


Fig. 41.

nächst wird die Kautschukverbindung zwischen dem Gefäße C und dem Kühler L mittels Klemmschraube geschlossen, ebenso der Hahn b, während durch den Hahn a Luft in das Gefäß A hineingelassen wird. Hierauf wird die Kautschukverbindung zwischen g und c losgelöst und durch vorsichtiges Öffnen des Hahnes b Luft in B und C hineingelassen. Es kann dabei passieren, daß durch zu rasches Öffnen des Hahnes b die Luft so heftig in B eindringt, daß ein Teil der Säure nach C hinübergeschleudert wird. Sind B und C mit Luft gefüllt, so wird der Inhalt dieser beiden Gefäße in ein Becherglas gegossen, die Wände sorgfältig mit Wasser nachgespült und die Säure zurücktitriert unter Anwendung einer Mischung von Lackmoid und Malachitgrün als Indikator. — 10 g Lackmoid werden in 150 ccm gelöst, filtriert und zum Filtrate 10—15 ccm einer Lösung von 1 g Malachitgrün in 50 ccm hinzugefügt.

Ammoniakbestimmung nach Steyrer¹⁾.

Eine bedeutende Zeitersparnis bietet diese Methode, die nichts anderes ist als eine Modifikation der Nencki- und Zaleskischen Methode. Man bringt 20—30 ccm Harn in den Kolben A (Fig. 41), läßt aus dem Tropftrichter T etwa 50 ccm Kalkmilch zufließen, schließt sofort den Hahn und setzt die Wasserstrahlpumpe F in Gang, wobei die Luftzufuhr durch den Hahn R so reguliert wird, daß das Vakuum nicht beeinträchtigt wird. Nun setzt man den Kolben in ein Wasserbad von ungefähr 36° C, und sobald der Druck 18—25 mm erreicht hat, beginnt die Flüssigkeit zu sieden, und ein Stoßen ist durch die regelmäßig durchstreichende Luft ausgeschlossen. Nach einer Stunde ist alles Ammoniak überdestilliert. Man spült dann die Kugel S in die Vorlage ab, ebenso das Rohr E und titriert die in der Vorlage B befindliche $\frac{1}{4}$ -Normalsäure zurück. Bei eiweißhaltigem Harn empfiehlt es sich, etwas Alkohol zuzusetzen, um ein Schäumen der Flüssigkeit zu verhindern.

Methode von Folin²⁾.

Man bringt 25 ccm Harn in einen dickwandigen Zylinder, der mit einem mit einem Zu- und Ableitungsrohr versehenen doppelt durchbohrten Stopfen verschlossen wird (Fig. 42), fügt 8—10 g Chlornatrium und 5—10 ccm Petroleum, Toluol, Methylalkohol oder Paraffinum liquidum hinzu, um das Schäumen zu verhindern, sowie etwa 1 g trockenes Natriumkarbonat und leitet einen starken Luftstrom durch den Harn. Der Luftstrom passiert zuerst eine mit Schwefelsäure beschickte Flasche, um die eintretende Luft ammoniakfrei zu machen. Die durch den Harn geleitete und mit Ammoniakdämpfen gesättigte Luft wird in eine bzw. zwei mit je 20—40 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsäure beschickte Vorlagen geleitet, wobei die Luft zuerst durch einen Baumwollpfropfen passiert, um vom etwa mitgerissenen Alkali befreit zu werden. Nun wird die in der Vorlage befindliche, das Ammoniak enthaltende Säure mit $\frac{1}{10}$ -Normalalkalilauge unter Benutzung von Alizarinrot (2 Tropfen einer

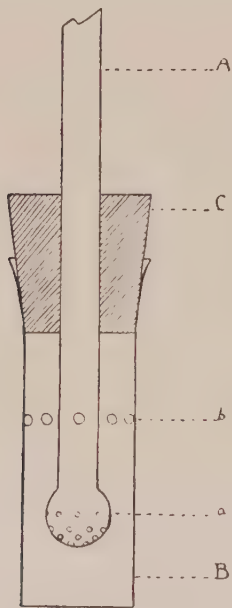


Fig. 42.

1 prozentigen Lösung bis zur Rotfärbung
0,001703 g NH_3 .

¹⁾ A. Steyrer, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **2**, 312 (1902).

²⁾ O. Folin, Eine neue Methode zur Bestimmung des Ammoniaks im Harn und anderen tierischen Flüssigkeiten. Zeitschr. f. physiol. Chemie **37**, 161 (1902).

Methode von Krüger¹⁾, Reich und Schittenhelm²⁾.

25—50 ccm Harn werden im Destillationskolben mit etwa 10 g Chlornatrium und 1 g Natriumkarbonat (bis zur alkalischen Reaktion) versetzt, der Kolben wird dann ins Wasserbad gesetzt und mit einer mit etwa 30 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalschwefelsäure, einigen Tropfen Rosolsäure und so viel Wasser beschickten und mit Eis gekühlten Peligotschen Röhre verbunden, daß die Querverbindung vollständig gefüllt ist; das andere Ende der Röhre ist mit der Wasserstrahlpumpe verbunden. Nun fügt man durch den am Kolben angebrachten Hahn Alkohol zum Verhindern des Schäumens hinzu und destilliert bei 43 °C und einem

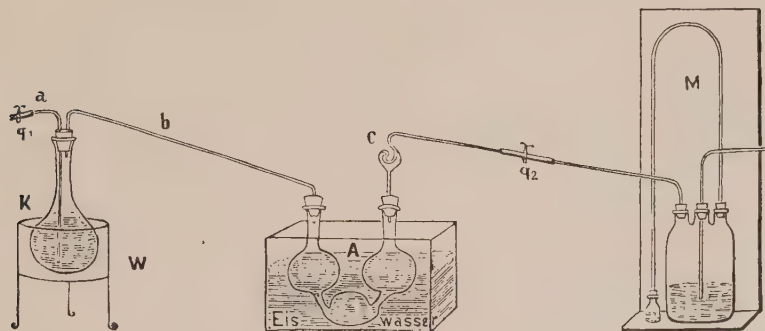


Fig. 43.

Druck von 30—40 mm Hg mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe. Je nach dem Verdampfen der Flüssigkeit werden 15—20 ccm Alkohol und etwa 10—15 ccm Wasser hinzugesetzt.

Methode von Ronchèse³⁾-Malfatti⁴⁾.

Die von Ronchèse-Malfatti vorgeschlagene Methode hat vor den eben beschriebenen den Vorzug, daß sie in wenigen Minuten ausgeführt wird, und den Nachteil, daß die Werte etwas unsicher sind, aber sie bietet die Möglichkeit, sich in kurzer Zeit zu vergewissern, ob die Ammoniakmenge eines Harns die Norm bedeutend überschreitet.

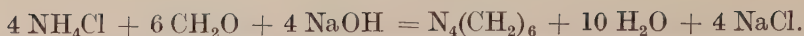
Diese Methode beruht auf folgendem Prinzip. Wird eine durch einige Tropfen Lauge und Phenolphthalein rot gefärbte Lösung eines Ammoniumsalzes mit einer bestimmten Menge mit Lauge neutralisierten Formalins versetzt, so verschwindet die Rotfärbung infolge Bildung von Hexamethylentetramin und tritt wieder auf nach Zusatz einer der vorhandenen Ammoniummenge entsprechenden Menge Lauge, nach folgender Gleichung:

¹⁾ M. Krüger und O. Reich, Zur Methodik der Bestimmung des Ammoniaks im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie **39**, 165 (1903).

²⁾ A. Schittenhelm, Zur Methodik der Ammoniakbestimmung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**, 173 (1903).

³⁾ A. Ronchèse, Neues Verfahren zur Bestimmung des Ammoniaks. Journ. de Pharm. et Chim. (6) **25**, 611 (1907).

⁴⁾ H. Malfatti, Eine klinische Methode zur Bestimmung des Ammoniaks im Harn. Zeitschr. f. anal. Chem. **47**, 273 (1908).



Der zu untersuchende Harn wird zuerst auf seine Azidität durch Titrieren mit $\frac{1}{10}$ -Normallauge unter Zufügung von einigen Tropfen Phenolphthalein als Indikator geprüft, dann mit 3 ccm Formalin, das vorher mit einigen Tropfen Lauge neutralisiert wird, versetzt, wobei die zuerst eingetretene Rotfärbung verschwindet. Nun titriert man weiter, bis die ursprüngliche Färbung eingetreten ist. Die nach dem Formalinzusatz verbrauchten Kubikzentimeter Lauge geben die Anzahl Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$ -Normalammoniak.

Ammoniakbestimmung nach Björn-Andersen¹⁾.

Man versetzt 20 ccm Harn im Destillationskolben mit 20 ccm Barytwasser, setzt den Pfropfen auf und schließt den Quetschhahn. In das Kugelrohr bringt man 20 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalschwefelsäure, schließt den Apparat und evakuiert und setzt dann den Kolben in ein auf 50 ° C erhitztes Wasserbad. Nach etwa 20 Minuten ist $\frac{3}{4}$ des Kolbeninhaltes und damit alles Ammoniak überdestilliert. Es besteht dabei große Neigung zur Bildung von Blasen, die den ganzen Kolben erfüllen, die aber platzen, wenn sie den Hals erreichen; in seltenen Fällen gehen sie zum Seitenrohr ab, weil sein erster Abschnitt eine schwache Neigung nach rückwärts hat und die geringe Menge Flüssigkeit, die beim Platzen der Blasen manchmal in das Seitenrohr gelangt, nicht in die Vorlage, sondern in den Kolben zurück abläuft. Die Titration geschieht am bequemsten im Kugelrohr selbst.

g) Kohlensäure.

Freie und gebundene Kohlensäure. Zur Bestimmung der im Harn gelösten Kohlensäure saugt man mittels einer Wasserstrahlpumpe Luft durch eine gemessene Menge (100 ccm) frisch aufgefangenen Harns durch, die vorher in einem mit Kalilauge gefüllten Geißlerschen Apparat von Kohlensäure befreit wird. Die so ausgetriebene Kohlensäure wird in einem mit einer gemessenen Menge titrierten Barytwassers gefüllten Pettenkoferschen Rohr aufgefangen und der Barytüberschuß zurücktitriert. Die gebundene Kohlensäure bestimmt man in der Weise, daß man zum Harn aus einem Hahntrichter verdünnte Schwefelsäure zufließen läßt, um sie auf solche Weise freizumachen, und verfährt weiter wie angegeben.

Gewichtsanalytisch bestimmt man freie und gebundene Kohlensäure, indem man zwei Proben frisch aufgefangenen Harns zu je 100 ccm, die eine mit einer reinen, die zweite mit einer ammoniakalischen Lösung von Bariumchlorid versetzt, die Flüssigkeit auf dem Wasserbade bis nahe zum Kochen erhitzt, die Niederschläge auf getrocknete und gewogene Filter bringt, auswäscht, bei 100 ° C trocknet, wägt und den Kohlensäuregehalt berechnet.

Björn-Andersen verwendet zur Kohlensäurebestimmung im

¹⁾ H. Björn-Andersen und Marius Lauritzen, Über Säure- und Ammoniakbestimmung im Urin und ihre klinische Anwendung. Zeitschr. f. physiol. Chem. 64, 21 (1910).

Harn den von ihm für die Ammoniakbestimmung benutzten Apparat (s. 334), indem er den Harn mit wenig Säure versetzt, im Vakuum destilliert und die entweichende Kohlensäure in dem mit einer gemessenen Menge titrierten Baryts beschickten Kugellohr auffängt. Der Barytüberschuß wird mit Säure unter Benutzung von Phenolphthalein als Indikator zurücktitriert.

h) Kohlenstoff.

Die Bestimmung des Kohlenstoffs in der organischen Substanz des Harnes geschieht durch Oxydation auf trockenem und auf nassem Wege. Auf trockenem Wege geschieht dieses mittels der Elementaranalyse, indem man 5—10 ccm Harn in einem Porzellanschiffchen im Gemenge mit feinem, mit Säure ausgekochtem, gewaschenem und geglühtem Quarzsand, oder im Gemenge mit präzipitiertem und geglühtem schwefelsauren Barium, oder noch besser mit fein zerriebenem geglühtem Bleichromat im Vakuum über Schwefelsäure bei gewöhnlicher Temperatur eintrocknet und mit chromsaurem Blei im Sauerstoffstrome verbrennt (s. 54).

Neuerdings sind vielfach erfolgreiche Versuche gemacht worden, die bei der Bestimmung des Brennwertes in der kalorimetrischen Bombe entstehende Kohlensäure in der bei der Elementaranalyse üblichen Weise zu ermitteln.

Steyrer¹⁾ bestimmt den Kohlenstoffgehalt des Harnes, indem er 5 ccm Harn in einem Porzellanschiffchen im Vakuum über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur eintrocknet. Bei sehr konzentrierten Harnen kommt es oft vor, daß sich beim Verdunsten auf der Oberfläche eine Kristallhaut bildet, die einerseits das weitere Eintrocknen stark beeinträchtigt und andererseits auch häufig springt wodurch sowohl feste als auch flüssige Teilchen aus dem Schiffchen geschleudert werden können. In solchen Fällen füllt man das Schiffchen mit ausgeglühten Bimssteinstücken. Die Verbrennung des so eingetrockneten Harnes geschieht im Kupferofen in einem mit Kupferoxydasbest gefüllten Verbrennungsrohr, in dessen vorderstem Teil sich eine 15 cm lange Schicht von Bleisuperoxyd, die auf 160—180° erhitzt wird, befindet. Für die Wasserabsorption dient ein Chlorkalziumrohr, die Kohlensäure wird in einem Geißlerschen Apparat aufgefangen. Die Verbrennung geschieht zuerst in gereinigtem Luftstrom, dann im Sauerstoff und schließlich wieder im Luftstrome.

Die Oxydation organischer Substanzen auf nassem Wege zur Bestimmung des Kohlenstoffs im Harn geschieht nach dem von Richardson²⁾ modifizierten Verfahren von Messinger in folgender Weise. 5 ccm Harn werden in einem Kolben mit Schwefelsäure und Chromsäure 1 Stunde gekocht, die entweichende Kohlensäure in Ammoniak aufgefangen, aus der ammoniakalischen Lösung mit Barium-

¹⁾ A. Steyrer, Beiträge z. chemischen Physiol. u. Pathol. **2**, 315 (1902).

²⁾ Richardson, Bulletin Mount Hope Retreat **19**, 50.

chlorid gefällt, der Niederschlag abfiltriert, in Normalsalpetersäure gelöst und der Salpetersäurenüberschuß mit $\frac{1}{2}$ -Normalnatronlauge zurücktitriert. Die in den Kolben eintretende Flüssigkeit passiert eine Flasche mit Natronlauge, wo sie von der Kohlensäure befreit wird. Zwischen dem Kolben und der Vorlage sind zuerst eine leere Flasche zur Aufnahme von Wasser, dann Flaschen mit Jodsäure, mit saurer Silbernitratlösung, mit salzsaurer Kaliumjodatlösung und mit konzentrierter Schwefelsäure eingeschaltet. Die Ammoniakflasche (Vorlage) ist mit einem Hempelschen Rohr zur Aufnahme von etwa entweichendem Ammoniumkarbonat versehen. Der durch die Wasserstrahlpumpe durchgesaugte Luftstrom wird durch eine Flasche mit Bariumhydroxydlösung geleitet.

Desgrez ¹⁾ empfiehlt, den Kohlenstoff in der Weise zu bestimmen, daß man 10 ccm Harn in einen 100 ccm fassenden Kolben bringt, dessen Glasschliff im Halse so tief sitzt, daß ein Zwischenraum zur Aufnahme von Quecksilber bleibt, und einerseits mit einem Rückflußkühler verbunden ist, andererseits mit einem rechtwinklig gebogenen Rohre, durch das man gegen Ende der Reaktion Luft eintreten läßt, um die im Apparat noch vorhandene Kohlensäure abzusaugen, ferner mit einem Tropftrichter versehen ist. Durch diesen läßt man 8 g Chromsäure in möglichst wenig Wasser gelöst und tropfenweise 30 ccm konzentrierte Schwefelsäure zufließen. Nun erhitzt man den Kolben zuerst mit einer kleinen Flamme und erhöht langsam die Temperatur zum Sieden. Sobald die Gasentwicklung aufgehört hat, läßt man mittels eines Aspirators oder einer Luftpumpe langsam etwa 20 Minuten einen Luftstrom durch den Apparat saugen. Die entweichenden Gase passieren zuerst eine Waschflasche mit konzentrierter Schwefelsäure, dann ein Natronkalkrohr und ein U-Rohr mit konzentrierter Kalilauge. Zur Absorption des Chlors und der Salzsäure dienen Flaschen mit trockenem Ferrozyankalium und trockenem Borax, die zwischen der Schwefelsäure und dem Kohlensäureabsorptionsapparat eingeschaltet sind. Das Natronkalkrohr und der Kohlensäureapparat (der Liebig'sche oder Geißler'sche) werden gewogen und die erhaltene Menge Kohlensäure auf Kohlenstoff umgerechnet.

i) Kieselsäure, Kalk, Magnesia, Kalium, Natrium.

100—200 ccm Harn werden in einer Platinschale auf dem Wasserbade eingedampft, im Trockenschrank bei 110° getrocknet, der Rückstand vorsichtig mit kleiner Flamme verkohlt, die kohlige Masse nach dem Erkalten mit einem Achatpistill in der Platinschale zerdrückt bzw. zerrieben, mit heißem Wasser auf dem Wasserbade ausgezogen und der wässrige Auszug durch ein aschefreies Filter dekantiert. Die in der Platinschale zurückgebliebene Kohle wird in derselben Weise noch 2—3 mal mit heißem Wasser behandelt, samt Filter im Trockenschrank getrocknet, dann allmählich zum starken Glühen erhitzt, bis

¹⁾ Desgrez, Compt. rend. de la Société de Biol. **49**, 1077 (1897).

die Masse grauweiß geworden ist und keine schwarzen Partikelchen mehr zu merken sind. Hierauf werden die vereinigten Wasserauszüge in die Platinschale mit der Asche gebracht, zur Trockne eingedampft, der Rückstand im Trockenschrank getrocknet und dann bei aufgelegtem Deckel schwach geglüht und nach dem Erkalten im Exsikkator gewogen. Die so erhaltene Asche wird mit verdünnter Salzsäure behandelt und mit salzsäurehaltigem Wasser aufgenommen. In dieser Lösung werden die einzelnen Bestandteile in der angegebenen Weise bestimmt.

Kalk und Magnesia lassen sich im Harn direkt ohne vorhergehende Veraschung in der Weise bestimmen, daß man ein etwa vorhandenes Sediment zuerst mit Salzsäure in Lösung bringt, dann mit überschüssigem Ammoniak versetzt, wobei die Phosphate des Kalziums und Magnesiums ausfallen, und über Nacht stehen läßt. Der Niederschlag wird auf dem Filter mit 2½ prozentigem Ammoniak ausgewaschen, in möglichst wenig verdünnter Salzsäure gelöst, das Filter öfter mit salzsäurehaltigem Wasser ausgewaschen, die salzsaure Lösung mit viel Ammoniumazetat und einigen Tropfen Eisessig versetzt, bis zum Kochen erwärmt und Ammoniumoxalat tropfenweise hinzugesetzt. Der nach 6 Stunden auskristallisierte Niederschlag wird auf ein aschefreies Filter gebracht, mit ammoniakhaltigem Wasser mehrmals gewaschen, im gewogenen Platintiegel verbrannt und bis zur Gewichtskonstanz geglüht, d. h. bis das oxalsaure Kalzium in Kalziumoxyd übergeführt wird. Der gefundene Wert, mit dem Faktor 0,7149 multipliziert, gibt die Menge Kalzium.

Anstatt das ausgeschiedene oxalsaure Kalzium zu glühen, kann man es in verdünnter Schwefelsäure lösen und die heiße trübe Lösung mit $\frac{1}{10}$ -Normalkaliumpermanganatlösung titrieren. 1 ccm der Kaliumpermanganatlösung entspricht 0,002005 g Ca.

Das Filtrat von der Ammoniumoxalatfällung wird zwecks Bestimmung der Magnesia auf dem Wasserbade eingeeengt, erkalten gelassen, mit einem $\frac{1}{3}$ des Volumens Ammoniak versetzt, wobei sich bald ein kristallinischer Niederschlag von phosphorsaurer Ammoniakmagnesia ausscheidet. Den Niederschlag bringt man auf ein aschefreies Filter, wäscht ihn mit ammoniakhaltigem Wasser aus, trocknet und erhitzt ihn in einem vorher geglühten und gewogenen Porzellantiegel oder Platintiegel zuerst mit kleiner Flamme, bis das Filter vollständig verbrannt ist, dann mit voller Flamme und glüht schließlich im Gebläse bis zur Gewichtskonstanz. Ist der Rückstand, das Magnesiumpyrophosphat, nicht weiß, so befeuchtet man ihn mit 1—2 Tropfen konzentrierter Salpetersäure und glüht wieder; man erhält dann einen schön weißen Niederschlag.

Quantitative Bestimmung des Kaliums im Harn nach Autenrieth und Bernheim¹⁾.

Erforderliches Reagens. Dieses stellt man dar, indem man 30 g kristallisiertes Kobaltnitrat in 60 ccm Wasser löst, mit 100 ccm einer 50 pro-

¹⁾ W. Autenrieth und R. Bernheim, Z. f. ph. Ch. 37, 29 (1903).

zentigen Natriumnitritlösung und 10 ccm Eisessig versetzt, wobei nach einigen Sekunden eine lebhaft entwickelte Entwicklung von farblosem Stickoxydgas beginnt. Die Lösung läßt man über Nacht stehen und filtriert den abgesetzten gelben Niederschlag ab. Diese Lösung bleibt 3 Wochen unverändert.

Man versetzt 50 ccm des filtrierten Harnes mit 6—10 ccm Kobaltreagens, schüttelt gut durch, läßt etwa 8 Stunden stehen, bringt den entstandenen Niederschlag, das Kobaltgelb, auf ein aschefreies Filter, wäscht ihn mit 40—60 ccm kalten, einige Kubikzentimeter Kobaltreagens enthaltenden Wassers aus und trocknet bei 110—120 ° C. Den Niederschlag bringt man mittels eines Pinsels in eine Porzellanschale, verascht das Filter in einer Platinschale, zieht die Asche mit heißem Wasser aus und filtriert in die Porzellanschale. Hierauf versetzt man den Niederschlag in der Porzellanschale tropfenweise mit 10 ccm einer 25 prozentigen Salzsäure, deckt die Schale mit einem Uhrglas zu und erhitzt gelinde auf dem Wasserbade, bis sich der Niederschlag gelöst hat. Die so erhaltene blaue salzsaure Lösung dampft man auf dem Wasserbade zur Trockne ein, übergießt den Rückstand mit etwas Wasser, fügt 10 ccm einer 18 prozentigen Überchlorsäure zu, rührt gut um, dampft wieder ein, bis weiße Nebel der Überchlorsäure entstehen und der Rückstand trocken geworden ist. Dieser Rückstand wird mit etwa 10 ccm eines 90 prozentigen, 0,2 Proz. Überchlorsäure enthaltenden Alkohols gut durchgerührt, wobei die Perchlorate von Natrium und Kobalt in Lösung gehen, während das Kaliumperchlorat ungelöst bleibt. Diesen wäscht man in einem mit dichter Asbestschicht beschickten Goochtiiegel zuerst mit einigen Kubikzentimetern überchlorsäurehaltigem Alkohol, dann mit einer aus gleichen Teilen bestehenden Alkohol-Äthermischung, bis eine Probe des Filtrates beim Eindunsten keinen Rückstand mehr hinterläßt, und trocknet bei 120—130 ° C bis zur Gewichtskonstanz. Die so erhaltene Menge Kaliumperchlorat, mit dem Faktor 0,28247 multipliziert, gibt die Menge Kalium an.

Bestimmung von Kalium und Natrium im Harn nach L. Garnier¹⁾.

100 bzw. 150 ccm filtrierter Harn, wenn das spezifische Gewicht niedriger als 1010 ist, wird in einem 300 ccm fassenden Erlenmeyerkolben mit 50 ccm Wasser, 2 g Kalziumsulfat, 1 Tropfen Phenolphthalein, 5 g trockenem gelöschten Kalk bis zur Rotfärbung, dann mit weiteren 5 g Kalk versetzt, der Kolben mit einem Gummistopfen verschlossen, in ein Wasserbad von 55 ° C gebracht und 15 Minuten darin stehen gelassen. Am nächsten Tage filtriert man die Flüssigkeit in einen mit Marken 100 und 102,1 ccm versehenen Kolben, füllt bis zur Marke 100 auf, setzt 1 g Ammoniumkarbonat zu, füllt mit starkem Ammoniak bis zur Marke 102,1, verschließt gut und läßt absitzen. Hierauf filtriert man, bringt die Hälfte des Filtrates in eine Platinschale, dampfzur Trockne ein, verkohlt den Rückstand, feuchtet die Kohle mit 3 ccm Schwefelsäure an und glüht unter wiederholtem Anfeuchten mit Schwefelsäure bis zur Bildung einer weißen Asche. Das Gewicht der Asche

¹⁾ Leon Garnier, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 58, 549.

minus 0,0015 g (Korrektur für Kalziumsulfat) und mit 2 multipliziert entspricht der Summe von Kalium und Natrium in Form von Sulfaten. Zur Bestimmung des Kaliums läßt man 50 ccm Harn mit 12—20 ccm Natriumkobaltnitritlösung (s. Bestimmung des Kaliums nach Autenrieth und Bernheim) über Nacht stehen, filtriert den Niederschlag von Kobaltgelb durch ein aschefreies Filter ab, wäscht ihn mit 50 ccm Wasser, dem 5 ccm Kobaltreagens zugesetzt sind, erwärmt ihn mit 10 ccm halbverdünnter Salzsäure bei bedecktem Glase, wobei eine blaue klare Lösung entsteht. Diese Lösung vereinigt man mit dem Filtrate, verdampft auf dem Wasserbade zur Trockne, löst den Rückstand in einigen Kubikzentimetern Wasser, versetzt mit 10 ccm einer 18 prozentigen Perchlorsäure, dampft bis zur Kristallisation ein, wäscht den Rückstand mit 15—20 ccm perchlorsäurehaltigem Alkohol, filtriert durch einen Goochtiiegel, dessen Asbestschicht vorher mit Schwefelsäure gewaschen wird, wäscht mit Alkohol aus, trocknet bei 130 ° C und wägt nach dem Erkalten im Exsikkator. Der so erhaltene Wert des Kaliumperchlorats, mit dem Faktor 0,6284 multipliziert, gibt die Menge Sulfat an; die Menge des Natriumsulfats erfährt man durch Subtraktion des Kalisulfatwertes von der Summe der Sulfate.

k) Eisen.

Nachweis. Der Harn wird mit dem Salpetergemisch zur Trockne eingedampft, verascht, mit salzsäurehaltigem heißen Wasser ausgezogen und mit Rhodan- oder Ferrozyankalium versetzt, wobei sich die Lösung bei Gegenwart von Eisen rot bzw. blau färbt.

Quantitative Bestimmung. Die Bestimmung des Eisens im Harn wird in verschiedener Weise ausgeführt; entweder nach der S. 117 angegebenen Methode oder nach dem Neumannschen Verfahren (s. 117) oder nach den speziell für den Harn ausgearbeiteten Methoden.

Methode von E. Hamburger¹⁾.

Der Harn wird in einer Platinschale auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft, vollständig verkohlt, die Kohle mit rauchender Salzsäure übergossen und auf dem Wasserbade erwärmt, um etwa vorhandenes kiesel-saures Eisen aufzuschließen. Hierauf wird die Kohle auf ein aschefreies Filter gebracht, mit heißem Wasser bis zum Verschwinden der sauren Reaktion ausgewaschen, dann vom Filter in die Platinschale übergespült und mit einer geringen Menge verdünnter Schwefelsäure übergossen, damit sich beim darauffolgenden Veraschen kein Eisenchlorid verflüchtige. Die Flüssigkeit wird nun auf dem Wasserbade stark konzentriert und die Kohle vollständig verbrannt. Das Filtrat wird dann zur Asche hinzugefügt, auf dem Wasserbade eingedampft, die Schwefelsäure durch vorsichtiges Erhitzen und unter Vermeidung des Spritzens verjagt und der Rückstand nochmals geglüht, um alle bei dem Verkohlen unverbrannt gebliebene organische

¹⁾ E. W. Hamburger, Über die Aufnahme und Ausscheidung des Eisens. Zeitschr. f. physiol. Chem. 2, 191 (1878/9).

Substanz zu zerstören. Es bildet sich dabei schwer lösliches Eisenoxyd, das man durch Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure in Lösung bringt. Die Lösung wird nun in einen doppelt tubulierten Kolben mit eingeschliffenen Gasleitungsröhren gebracht. Das eine Rohr, durch das die Kohlensäure eingeleitet wird, befindet sich im oberen Quadranten des Kolbens und reicht nur bis an die Oberfläche der Flüssigkeit; das andere 6 mm weite Rohr, durch das die Gase entweichen, ist im Kolben des Halses eingeschnitten und steigt 25 cm senkrecht in die Höhe, damit die in dasselbe gerissene Flüssigkeit zurückfließen kann; hier ist es wieder senkrecht nach unten gebogen und taucht mit der unteren Mündung in die vorgelegte Flüssigkeit, so daß keine Luft in den Kolben dringen kann. Der Kolben faßt 500 ccm. Man gießt nun die Lösung in den Kolben, fügt eine genügende Menge schweflige Säure hinzu, setzt die Röhren ein, erhitzt die Flüssigkeit fast zum Sieden und leitet währenddessen einen mit schwefelsaurem Kupfer und dann mit Soda gewaschenen Kohlensäurestrom durch den Kolben. Die vollständige Vertreibung der schwefligen Säure dauert mehrere Stunden; um den Punkt zu erkennen, leitet man das entweichende Gas durch eine stark verdünnte Kaliumpermanganatlösung — ändert sich die Farbe derselben nach 20 Minuten nicht mehr, so ist keine schweflige Säure mehr zugegen. Man läßt die Flüssigkeit im Kohlensäurestrom erkalten, spritzt die in den Kolben reichenden Rohrstücke mit ausgekochtem Wasser und titriert mit einer Kaliumpermanganatlösung, die etwa 0,5 g Kaliumpermanganat in 2 Litern Wasser enthält. Der Titer dieser Lösung wird gegen eine Lösung einer gewogenen Menge Eisen (Blumendraht, von dessen Gewicht 0,4 Proz. für Kohlenstoff in Abzug gebracht wird) in reiner Schwefelsäure bestimmt.

Methode von Kuntzen und Krummacher¹⁾.

Kuntzen und Krummacher modifizieren das Verfahren von Hamburger, indem sie die Reduktion des als Ferrisulfat gelösten Eisens statt mit Schwefeldioxyd im Kohlensäurestrom mit metallischem Zink durchführen.

Die erhaltene schwefelsaure Eisenlösung, die 3 ccm konzentrierte Schwefelsäure in 60 ccm Gesamtflüssigkeit enthält, wird mit 1 g Zink nach Zusatz von 3 Tropfen Platinchlorid (1:20) in der Wärme im Kohlensäurestrom reduziert. Das Platinchlorid, dem eine katalytische Wirkung zukommt, ist notwendig, weil sich reines Zink in Schwefelsäure der angegebenen Konzentration äußerst schwer löst. Die Reduktion geschieht in einem 200 ccm fassenden Kolben, der mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen versehen ist. Die eine Öffnung trägt ein knieförmig gebogenes Glasrohr, das mittels eines Schlauches mit dem Kohlensäureapparat verbunden ist, durch die andere Öffnung führt ein gerades, mit einem Bunsenventil versehenes Glasrohr. Dem Kolben wird durch Festklemmen eine schräge Lage gegeben, so daß

¹⁾ A. Kuntzen und O. Krummacher, Über subkutane Hämoglobin-injektionen. Zeitschr. f. Biologie 40, 228 (1900).

nur die Wand des kugeligen Teiles von verspritzter Flüssigkeit getroffen werden kann. Zunächst wird zur Verdrängung der Luft im Kolben einige Minuten Kohlensäure bei geöffnetem Ventil durchgeleitet, dann das Ventil geschlossen und nunmehr unter Verwendung eines Drahtnetzes bis nahe zum Sieden erhitzt, vorher aber die Verbindung mit dem Kohlensäureapparat durch einen Quetschhahn abgesperrt. Beim Erwärmen entweicht anfangs etwas Gas durch das Bunsenventil. Ist alles Zink gelöst, so wird die Flamme entfernt und durch Öffnung des Quetschhahnes die Verbindung mit dem Kohlensäureapparat wieder hergestellt. Es strömt dann so viel Kohlensäure nach, bis der Druck im Kolben gleich demjenigen im Apparat ist.

Methode von Socin¹⁾.

Der Harn wird in einer Platinschale mit Natriumkarbonatlösung bis zur deutlich alkalischen Reaktion, dann mit dem gleichen Volumen Sodalösung versetzt, auf dem Wasserbade unter öfterem Umrühren eingedampft und im Trockenschrank bei 120 ° C getrocknet. Der Trockenrückstand wird bei beginnender Rotglut verkohlt, die Kohle mit heißem Wasser ausgelaugt, durch ein aschefreies Filter filtriert, ausgewaschen, Filter und Kohle in die Platinschale gebracht und im Trockenschrank getrocknet. (Das Waschwasser, das kein Eisen enthält, wird für die weitere Behandlung nicht gebraucht.) Die vollständig trockne Kohle mit dem Filter wird verascht, die Asche mit verdünnter Salzsäure und heißem Wasser eingedampft und bei aufgelegtem Uhrglas auf etwa 110 ° C erwärmt, wobei die Kieselsäure ausfällt. Die Asche wird wieder in etwas Salzsäure und möglich wenig Wasser gelöst, durch ein aschefreies Filter filtriert, ausgewaschen, das Filtrat mit etwas Ammoniak abgestumpft und nach dem Erkalten mit essigsaurem Ammon versetzt, wodurch das Eisen als phosphorsaures Eisen gefällt wird. Der flockige Niederschlag wird durch ein aschefreies Filter filtriert, mit kaltem Wasser ausgewaschen, bei 120 ° C getrocknet, vom Filter möglichst entfernt, das Filter im Porzellantiegel verbrannt, der Niederschlag in den Tiegel gebracht, geglüht und nach dem Erkalten gewogen.

25. Eiweißkörper und Eiweißabbauprodukte.

a) Eiweiß.

Nachweis. Unter den vielen zum Nachweis von Eiweiß im Harn vorgeschlagenen Reaktionen mögen hier folgende erwähnt sein.

Kochprobe. Der zu prüfende Harn wird zuerst filtriert und muß dann absolut klar sein. Gelingt es nicht, einen Harn durch einmaliges Filtrieren zu klären, so gießt man ihn mehrmals durch dasselbe Filter oder zentrifugiert ihn. Die Anwendung von Entfärbungs- bzw. Klärungsmitteln, wie Tierkohle, Kaolin, Talkum, kolloidalem Eisenhydroxyd, Magnesia oder Kieselgur, ist möglichst zu vermeiden, da diese Eiweiß adsorbieren. Ein stark sauer reagierender Harn wird vor dem Kochen mit Alkali etwas abgestumpft, einen alkalischen Harn

¹⁾ C. A. Socin, In welcher Form wird das Eisen resorbiert? Zeitschr. f. physiol. Chem. 15, 91 (1891).

macht man neutral oder sehr schwach mit Essigsäure sauer. Man erhitzt nun eine Probe des klar filtrierten Harnes in einem Reagenzrohre zum Sieden und versetzt mit einigen Tropfen Salpetersäure — entsteht eine Trübung oder ein Niederschlag, so ist Eiweiß zugegen; bildet sich dagegen keine Trübung, Fällung oder Opaleszenz, so ist kein koagulables Eiweiß vorhanden, der Harn kann aber Albumosen oder Peptone enthalten.

Nach L. de Jager¹⁾ führt man die Kochprobe in der Weise aus, daß man 10 ccm Harn mit 1 ccm einer 10 prozentigen Kaliumoxalatlösung versetzt, filtriert durch ein dichtes Filter, wenn nötig mehrmals, bis das Filtrat klar abläuft. Man kocht nun eine Probe des Filtrates — entsteht ein Niederschlag, so ist Eiweiß zugegen; bleibt eine zweite, mit 2—3 Tropfen verdünnter Essigsäure angesäuert, nach dem Kochen klar, so ist kein Eiweiß vorhanden.

Hellersche Probe. Schichtet man eine Probe Harn in einem Reagenzglase mittels einer Pipette mit dem gleichen Volumen konzentrierter Salpetersäure, indem man die Pipette bis auf den Boden des Reagenzglases eintauchen läßt und vorsichtig den Finger lüftet, so entsteht an der Berührungsstelle beider Flüssigkeiten ein grau-weißer Ring, der von der Gegenwart des Eiweißes herrührt.

Ein über der Berührungsstelle beider Flüssigkeiten entstehender Ring rührt von muzinähnlicher Substanz oder Harnsäure her; man verdünne solche Harn mit der gleichen bzw. der doppelten Menge Wasser, dann kommt der Ring nicht mehr zum Vorschein.

Ferrozyankalium-Essigsäureprobe. Versetzt man 5 ccm Harn mit 4 Tropfen Essigsäure und dann 2 Tropfen 10 prozentiger Ferrozyankaliumlösung, so bildet sich bei Gegenwart von Eiweiß (ohne Erwärmen!) ein gelblichweißer, feinflockiger Niederschlag oder bei sehr geringen Eiweißmengen eine deutliche Trübung. Scheidet sich auf Zusatz der Essigsäure Muzin aus, so muß vor dem Zusatz der Ferrozyankaliumlösung abfiltriert werden.

Säuert man die Harnprobe mit Essigsäure an, versetzt dann mit dem doppelten Volumen gesättigter Natriumsulfat- oder Natriumchloridlösung und erhitzt zum Kochen, so fallen alle Eiweißstoffe, außer den Peptonen, aus; Albumosen fallen erst beim Erkalten aus.

Spiegler's Probe²⁾. Als Reagens dient eine Lösung von 8 g Quecksilberchlorid, 4 g Weinsäure, 20 g Glycerin in 200 ccm Wasser. Nach Jolles³⁾ besteht das Reagens aus 10 g Quecksilberchlorid, 20 g Bernsteinsäure, 10 g Kochsalz in 500 ccm Wasser.

Schichtet man 4—5 ccm filtrierten Harn auf das in einem Probierröhrchen befindliche Reagens, so entsteht nach etwa 1 Minute an der Berührungsstelle beider Flüssigkeiten ein scharfer, weißlicher Ring.

Um festzustellen, welcher Art das im Harn mit den oben angegebenen Reaktionen nachgewiesene Eiweiß ist, bedient man sich folgender Reaktionen.

Globulin und Albumin. Um Serumglobulin nachzuweisen, neutralisiert man den Harn, filtriert und sättigt bei Zimmertemperatur mit Magnesiumsulfat in Substanz oder setzt das gleiche Volumen einer gesättigten, neutral reagierenden Lösung von Ammoniumsulfat hinzu, wodurch bei Gegenwart von Globulin ein weißer flockiger Niederschlag entsteht. In einem uratreichen Harn ruft Ammoniumsulfat einen Niederschlag von Ammoniumurat hervor, dernicht sogleich, sondern erst nach einiger Zeit sich ausscheidet. Die von dem Globulin-niederschlag abfiltrierte Lösung erhitzt man zum Sieden unter Zusatz eines Tropfens Essigsäure, wobei sich Serumalbumin ausscheidet (Hammarsten)⁴⁾.

Albumosen. Nach dem Verfahren von Hofmeister, modifiziert von Salkowski und Aldor⁵⁾, weist man Albumosen nach, indem man 500 ccm des zu prüfenden Harnes in einem Becherglas mit 10 ccm Natriumazetatlösung und konzentrierter Eisenchloridlösung bis zur bleibenden Rotfärbung tropfenweise versetzt, mit Natronlauge bis zur schwach sauren Reaktion abstumpft,

¹⁾ L. de Jager, Beiträge zur Harnchemie. Zeitschr. f. physiol. Chemie **62**, 333 (1909).

²⁾ E. Spiegler, Chem. Ber. **25**, 375 (1892).

³⁾ A. Jolles, Zeitschr. f. physiol. Chemie **21**, 306 (1895).

⁴⁾ Hammarsten, Über Fibrinogen. Pflügers Archiv **22**, 431.

⁵⁾ E. Salkowski, Über den Nachweis von Pepton im Harn. Zentralbl. f. med. Wissensch. **32**, 113 (1894). — v. Aldor, Über den Nachweis der Albumosen im Harn und über die enterogene Albumosurie. Berlin. klin. Wochenschr. **36**, 764 u. 785 (1899).

erhitzt, bis das Eiweiß sich flockig ausscheidet und nach dem Erkalten filtriert. Ein Zusatz von Essigsäure und Ferrozyankalium darf weder einen grauen (Eiweiß), noch einen blauen (Eisen) Niederschlag hervorrufen. Nun versetzt man die Flüssigkeit mit 10prozentiger konzentrierter Salzsäure, fällt mit Phosphorwolframsäure und erhitzt auf dem Wasserbade. Die klare Flüssigkeit wird von dem harzigen Bodensatz abgossen, die Masse mit Wasser ausgewaschen, darauf mit ein wenig Wasser und Natronlauge unter Erwärmen gelöst, wobei die grüne Färbung verschwindet. Nach dem Erkalten versetzt man tropfenweise mit 10prozentiger Kupfersulfatlösung, wodurch eine violette oder rötliche Farbe (Biuretreaktion) auftritt.

Der Vorschlag von Aldor, den Phosphorwolframsäureniederschlag mit absolutem Alkohol zu behandeln, um das mitgefallene Urobilin zu entfernen, bedarf einer Nachprüfung, weil das Urobilin durch Alkohol nicht vollständig, aber durch Chloroform ausziehbar ist (Cerny)¹⁾.

Bang²⁾ weist Albumosen auch in Gegenwart von koagulablem Eiweiß in der Weise nach, daß er die Harnprobe (10 Teile) mit 8 Teilen festen Ammoniumsulfats einige Sekunden kocht, die noch heiße Flüssigkeit etwa 1 Minute zentrifugiert, wobei sich ein Niederschlag ausscheidet, der Albuminstoffe, Albumosen, Harnsäure, Salze, Urobilin enthält. Aus diesem Niederschlage wird das Urobilin durch Zerreiben mit 97prozentigem Alkohol ausgezogen, der Rückstand wird dann mit wenig Wasser aufgeschlemmt, zum Sieden erhitzt, vom koagulierten Eiweiß abfiltriert und das Filtrat mit Chloroform geschüttelt, um den Rest des Urobilins zu gewinnen. Im Filtrat weist man die Gegenwart der Albumosen mittels der Biuretprobe nach, indem man es stark alkalisch macht und mit 10prozentiger Kupfersulfatlösung tropfenweise versetzt — der Niederschlag löst sich mit rotvioletter Farbe.

Morawitz und Dietschy³⁾ weisen Albumosen nach, indem sie 500 ccm Harn mit einer Lösung von saurem Kaliumphosphat schwach ansäuern, mit dem doppelten Volumen 90prozentigen Alkohols 5—6 Stunden auf dem Wasserbade unter Rückflußkühler auf 80—90° C erwärmen und erkalten lassen. Das Filtrat vom koagulierten Eiweiß wird auf etwa 300 ccm bei 50—60° C eingedampft, mit verdünnter (25prozentiger) Schwefelsäure (2 ccm auf 100 ccm Lösung) versetzt und mit Zinksulfat in Substanz gesättigt, wodurch nach einigen Stunden Albumosen und Urobilin ausfallen. Die Flüssigkeit samt Niederschlag wird erwärmt und warm abgesaugt. Hierauf wird der Niederschlag zur Entfernung des Urobilins mit absolutem Alkohol 24 Stunden lang extrahiert.

b) Bence-Jonesscher Eiweißkörper⁴⁾.

In naher Beziehung zu den Albumosen steht der Bence-Jones'sche Eiweißkörper. Er besitzt die Eigenschaft, beim Erwärmen des Harnes auf 40—60° C eine Trübung, bei 50—60° eine flockige Fällung zu geben, die beim Erhitzen zum Sieden, je nach der Reaktion und dem Salzgehalt, mehr oder weniger vollständig sich wieder löst und beim Erkalten sich wieder ausscheidet. Ist der Harn sehr salzarm, so fügt man etwas konzentrierte Kochsalzlösung hinzu. Durch das doppelte Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung oder durch Alkohol wird er aus dem Harn gefällt.

¹⁾ Cerny, Zeitschr. f. anal. Chem. 40.

²⁾ Devoto, Über den Nachweis des Peptons und eine neue Art der quantitativen Eiweißbestimmung. Zeitschr. f. physiol. Chemie 15, 465 (1891). — Bang, Zum Nachweis der Albumosen im Harn. Skandin. Archiv 8, 272 (1898).

³⁾ Morawitz und Dietschy, Über Albumosurie nebst Bemerkungen über das Vorkommen von Albumosen im Blute. Archiv f. experim. Pathol. 54, 88 (1905).

⁴⁾ A. Magnus-Levy, Über den Bence-Jonesschen Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie 30, 200 (1900). — A. Grutterink und C. de Graaff, Zeitschr. f. physiol. Chemie 34, 393 (1901); 46, 472 (1905). — E. Abderhalden und O. Rostoski, Beitrag zur Kenntnis des Bence-Jonesschen Eiweißkörpers. Zeitschr. f. physiol. Chemie 46, 125 (1905).

Diesen Körper stellt man dar, indem man eine größere Menge Harn neutralisiert, mit dem doppelten Volumen kalt gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt, den braun gefärbten Niederschlag abfiltriert, mit Ammoniumsulfatlösung auswäscht, in Wasser löst und die Ausfällung 3—4 mal wiederholt. Den abgepreßten, noch feuchten Niederschlag löst man in 3 prozentiger siedender Kochsalzlösung unter tropfenweisem Zusatz von Salzsäure, filtriert die Lösung durch einen Heißwassertrichter und läßt erkalten, wobei sich der Eiweißkörper ausscheidet. Den so ausgeschiedenen Niederschlag reinigt man durch Dekantieren und Zentrifugieren und entfernt das Kochsalz durch Dialysieren gegen gesättigtes Chloroformwasser. Die dialysierte Flüssigkeit wird bei 35—40 ° C auf ein kleines Volumen eingedampft, mit 2 Volumen absoluten Alkohols versetzt, der dabei ausgeschiedene Eiweißkörper abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Quantitative Bestimmung des Harneiweißes. Sämtliche in Vorschlag gebrachten Methoden zur Bestimmung des Eiweißes im Harn beruhen auf der Eigenschaft der Eiweißkörper, beim Erhitzen in schwach saurer Lösung oder nach Zusatz von Salzen zu koagulieren.

Nach Scherer verfährt man in der Weise, daß man 50—100 ccm Harn in einer Porzellanschale unter öfterem Umrühren über einer kleinen Flamme erhitzt und, falls keine flockige Gerinnung erfolgt, mit einigen Tropfen stark verdünnter Essigsäure versetzt, wieder zum Sieden erhitzt und prüft, ob die Flüssigkeit über dem Koagulum klar ist. Nun wird das Koagulum durch ein bei 120 ° getrocknetes, gewogenes aschefreies Filter abfiltriert, mit warmem Wasser, dann mit Alkohol und Äther sorgfältig ausgewaschen, bei 110—120 ° C getrocknet und nach dem Erkalten gewogen. Der Niederschlag nebst Filter wird in einem Platintiegel verascht und gewogen, das so erhaltene Aschengewicht wird von dem Gewicht der Trockensubstanz abgezogen.

Devoto ¹⁾ bestimmt das Eiweiß, indem er 100 ccm filtrierten, sauer reagierenden bzw. angesäuerten Harn in einem Becherglase mit 80 g Ammoniumsulfat versetzt, bis zur Lösung des Salzes im Wasserbade unter Umrühren erwärmt und 30—40 Minuten in einem Dampftopf erhitzt. Das ausgeschiedene Eiweißkoagulum wird durch ein getrocknetes, gewogenes aschefreies Filter abfiltriert, ausgewaschen, getrocknet und gewogen usw. Bei eiweißarmen und zugleich harnsäurereichen Harnen gibt diese Methode ungenaue Resultate, da andere Harnbestandteile mit dem Koagulum ausfallen. Der Vorzug dieser Methode besteht darin, daß ein Überschuß von Säure nicht schadet.

Sehr zuverlässige Resultate erhält man auch, wenn man den Harn in einem Erlenmeyerkolben mit $\frac{1}{5}$ Volumen einer gesättigten Kochsalzlösung und mit einer stark verdünnten Essigsäure bis zur schwach sauren Reaktion versetzt, den Kolben in das Wasserbad stellt und erhitzt, bis sich ein flockiges Koagulum ausscheidet und die darüber

¹⁾ Devoto, Über den Nachweis des Peptons. Zeitschr. f. physiol. Chemie 15, 465 (1891).

stehende Flüssigkeit vollständig klar erscheint. Ist dies nicht der Fall, so fügt man noch einige Tropfen der verdünnten Essigsäure hinzu und erhitzt weiter.

Annähernde Bestimmung nach Esbach. Diese Methode beruht auf der Fällung des Eiweißes mittels Pikrinsäure und Ablesung des Prozentgehaltes aus der Höhe des Niederschlages in dem bekannten Albuminometer.

Man füllt das Esbachsche Röhrchen bis zur Marke U mit dem sauer reagierenden bzw. mit Essigsäure angesäuerten Harn und setzt bis zur Marke R das Esbachsche Reagens hinzu, schüttelt vorsichtig um und läßt an einem kühlen Ort 24 Stunden stehen. Nun liest man an den Teilstrichen die Menge des ausgeschiedenen Eiweißes in Grammen für 1000 ccm Harn ab.

Das Esbachsche Reagens besteht aus einer Lösung von 10 g Pikrinsäure, 20 g Zitronensäure in 1000 ccm Wasser.

Annähernde Bestimmung nach Roberts¹⁾. Diese Methode beruht auf der Beobachtung, daß bei der Hellerschen Eiweißprobe das Auftreten eines Ringes an der Berührungsfläche zwischen Salpetersäure und eiweißhaltiger Flüssigkeit nach 2—3 Minuten schwach, aber deutlich sichtbar wird, wenn die Lösung 0,0033 Proz. Eiweiß enthält. Die Methode ist von Stolnikow und Brandberg²⁾ modifiziert worden.

Man verdünnt den Harn auf das Zehnfache mit Wasser und bereitet von diesem verdünnten Harn eine Reihe von Versuchsflüssigkeiten bekannter Verdünnung. Dann bringt man in eine Anzahl Reagenzgläser, hinter denen sich ein schwarzer Hintergrund befindet, mit einer Pipette einige Kubikzentimeter konzentrierter Salpetersäure, ohne die Glaswandungen zu benetzen, fügt in die einzelnen Gläser mit einer sehr fein ausgezogenen Pipette etwa gleiche Volumina der verschiedenen verdünnten Harnlösungen, so daß beide Flüssigkeiten sich nicht mischen, und notiert die Zeit, wann in jeder ein sichtbarer bläulich-weißer Ring auftritt. Diejenige Probe, in der das innerhalb 2—3 Minuten geschieht, enthält 0,0033 Proz. Eiweiß. Man erfährt den Eiweißgehalt des un-

verdünnten Harnes durch folgende Gleichung: $p = \frac{K + X}{K \cdot 30}$, in der p

die Prozente Eiweiß im unverdünnten Harn, K die zu jeder Probe verwendete Menge Zehntelharn und X die zur Verdünnung verwendete Wassermenge sind.

Bestimmung des Globulins nach Hofmeister und Pohl³⁾. Man versetzt 50—100 ccm Harn in einem Becherglas mit Ammoniak bis zum Verschwinden der sauren Reaktion und mit dem gleichen

¹⁾ Roberts, The Lancet, I, 313 (1876).

²⁾ J. Stolnikow, Eine neue Methode für quantitative Eiweißbestimmung im Harne. Malys Jahresber. 6, 148 (1877). — J. Brandberg, Approximative Eiweißbestimmung im Harne. Malys Jahresber. 10, 265 (1880).

³⁾ Fr. Hofmeister und Julius Pohl, Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Globulins im Harn und serösen Flüssigkeiten. Archiv f. exper. Pathol. und Pharm. 20, 426 (1886).

Volumen einer gesättigten, neutral reagierenden Ammoniumsulfatlösung, wodurch ein Niederschlag entsteht. Nach einer Stunde bringt man den Niederschlag auf ein getrocknetes und gewogenes, aschefreies Filter, wäscht mit halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung bis zum Verschwinden der Reaktion mit Ferrozyankalium und Essigsäure im Filtrat. Hierauf trocknet man das Filter mit dem Niederschlag bei 110 ° C, wäscht dann mit kochendem Wasser, Alkohol und Äther aus und verfährt weiter wie beim Eiweiß. Die Menge Albumin erfährt man durch Subtraktion der Globulinmenge von dem Gesamteiweißgehalt.

c) Nukleoalbumin und Muzin.

Die durch Essigsäurezusatz aus dem Harn isolierten, als „ungelöstes Muzin“ oder „Nukleoalbumin“ bezeichneten Substanzen sind nach Mörner¹⁾ Verbindungen von Eiweiß und eiweißfällenden Säuren, hauptsächlich Chondroitinschwefelsäure, in geringerem Maße Nukleinsäure und unter Umständen auch Taurocholsäure.

Nachweis. Wird ein Harn mit Wasser verdünnt, um den Einfluß der Harnsalze zu beseitigen, und mit Essigsäure stark sauer gemacht, so trübt er sich oder wird sogar gefällt und zeigt eine weit ausgesprochenere Hellersche Eiweißprobe als der unverdünnte Harn, in Gegenwart von Nukleoalbumin.

Zur Isolierung und Untersuchung des sogenannten Nukleoalbumins verfährt man nach Hammarsten in der Weise, daß man eine möglichst große Menge Harn der Dialyse unter Zusatz von Chloroform unterwirft, um die die Ausfällung des Nukleoalbumins durch Essigsäure hindernden Harnsalze zu entfernen. Hierauf setzt man Essigsäure, etwa 2 Promille, hinzu, löst den nach einigen Stunden ausgeschiedenen Niederschlag in Wasser unter Zusatz von möglichst wenig Alkali und fällt wieder mit Säure. Zur Prüfung auf Chondroitinschwefelsäure wird ein Teil längere Zeit im Wasserbade mit etwa 5 Proz. Salzsäure erwärmt. Erhält man bei der Prüfung auf Schwefelsäure und reduzierende Substanz ein positives Resultat, so liegt Chondroproteid vor. Reduziert die Lösung, enthält aber keine Schwefelsäure, so ist die Anwesenheit von Muzin wahrscheinlich. Fallen beide Reaktionen negativ aus, so wird ein Teil des Niederschlages der Pepsinverdauung unterworfen und ein anderer Teil zur Bestimmung des etwa vorhandenen organisch gebundenen Phosphors verwendet. Ist das Resultat dieser Proben positiv, so stellt man zur Unterscheidung zwischen Nukleoalbumin und Nukleoproteid eine besondere Untersuchung an.

Spaeth hat ein Verfahren vorgeschlagen, nach dem man das wahre Nukleoalbumin und das Muzin von dem sogenannten Nukleoalbumin oder von der muzinähnlichen Substanz unterscheiden kann.

Man verdünnt den Harn mit der dreifachen Menge Wasser, versetzt mit Essigsäure und löst den entstandenen, ausgewaschenen Niederschlag in verdünntem Alkali. Die Lösung fällt man bei 30 ° C

¹⁾ K. Mörner, Untersuchungen über Proteinstoffe und eiweißfällende Substanzen des normalen Menschenharnes. Skandin. Archiv f. Physiol. **6**, 332 (1895). — Oswald, Untersuchungen über Harneiweiß. Hofmeisters Beiträge **5**, 234 (1904). — K. Mörner, Bemerkungen zu dem Aufsatz Oswalds. Hofmeisters Beiträge **5**, 524 (1904).

mit Magnesiumsulfat, löst den Niederschlag in Wasser, fällt nochmals mit Essigsäure, um den Rest des noch vorhandenen Kalziumphosphats zu entfernen, und wäscht den Niederschlag mit absolutem Alkohol aus, schmilzt ihn mit Soda und Salpeter und prüft auf Phosphor. Enthält die Schmelze Phosphor, so ist die Anwesenheit von wahren Nukleoalbumin bewiesen.

Zum Nachweis des Muzins wäscht man den Essigsäureniederschlag mit warmem Alkohol, löst ihn in Wasser, dem etwas Alkali hinzugesetzt wird, versetzt mit einem Überschuß von verdünnter Salzsäure, kocht und teilt die Lösung in zwei Teile. Ein Teil wird alkalisch gemacht und auf Kohlehydrate mit der Reduktionsprobe geprüft, wobei ein positives Resultat auf die Gegenwart von Muzin hinweist. Der andere Teil wird mit Bariumchlorid versetzt, wobei eine Fällung auf eine Verbindung von Chondroitinschwefelsäure mit Eiweiß, „sogenanntes Nukleoalbumin“, „sogenanntes Muzin“, hindeutet. Die Abwesenheit von Schwefelsäure beweist Muzin.

d) Aminosäuren.

Für den Nachweis der Aminosäuren im Harn müssen diese zuerst isoliert und dann nach einer der vielen vorgeschlagenen Methoden identifiziert werden. Hier sollen nur Methoden von allgemeiner Anwendung besprochen werden. Es hat sich als sehr zweckmäßig erwiesen, bei der Untersuchung des Harnes auf Aminosäuren diese in bestimmte, wohlcharakterisierte, schwerlösliche Derivate überzuführen, wie die β -Naphthalinsulfoverbindungen, die Naphthylisozyanatverbindungen, die Benzoylverbindungen, die Phenylisozyanatverbindungen.

β -Naphthalinsulfochloridmethode. Etwa 500 ccm Harn werden zuerst mit Wasser stark verdünnt, um das bei der Fällung sich bildende, bei stärkerer Konzentration sonst schwerlösliche Leuzinblei in Lösung zu erhalten, unter vermindertem Druck wird bei schwach alkalischer Reaktion bis zur Trockne eingedampft, um das Ammoniak zu entfernen, das mit dem β -Naphthalinsulfochlorid das schwerlösliche, die weitere Untersuchung störende β -Naphthalinsulfamid bildet; der Rückstand wird wieder in Wasser gelöst, mit Natronlauge alkalisch gemacht, mit Bleiazetat gefällt und vom Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat vom Bleiniederschlag behandelt man mit Schwefelwasserstoff, filtriert von dem ausgeschiedenen Bleisulfid ab und dampft das Filtrat bei 45° C unter vermindertem Druck bis auf die Hälfte des angewandten Harnvolumens. Die so erhaltene Lösung wird nach Ignatowski zur Entfernung der Phenole, Oxysäuren, Hippursäure mit Salzsäure angesäuert, mit dem halben Volumen Äther und dann fünf- bis sechsmal mit Essigäther durchgeschüttelt.

Der auf diese Weise vorbereitete Harn wird in eine Stöpselflasche gebracht, mit 2 g β -Naphthalinsulfochlorid in 10prozentiger Ätherlösung versetzt und das Gemisch in der Schüttelmaschine etwa 8—9 Stunden geschüttelt, wobei man alle 1—1½ Stunden 1 g des Reagens in Ätherlösung zufügt, die Reaktion des Gemisches kontrolliert und durch Zusatz von Normalnatronlauge stets deutlich alkalisch hält. Das Gemisch wird in einen Scheidetrichter gebracht und, nachdem sich die Schichten getrennt haben, gießt man den Äther ab, filtriert die wässrige Lösung und übersättigt mit Salzsäure. Sind Aminosäuren vorhanden, tritt Trübung, oft Abscheidung eines Öles und auch fester Substanzen ein. Bei reichlichen Fällungen kann durch Abkühlen und längeres Stehen Kristallisation oder Erstarrung der öligen Masse eintreten; in solchen Fällen wird die überstehende Flüssigkeit abgegossen und das erhaltene Rohprodukt durch Lösen in Alkali und Fällen mit Säure gereinigt. In den meisten Fällen erhält man eine mehr oder weniger starke Trübung oder eine schmierige, zum Teil erstarrende Masse. Man versetzt die saure Lösung mit der gleichen Menge Äther und schüttelt gut durch, wodurch alles in Äther übergeht. Die Ätherlösung wird abgelassen und die Ausschüttelung noch zweimal mit neuen

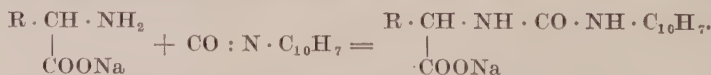
Äthermengen wiederholt. Die vereinigten Ätherauszüge werden so lange mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser keine Chlorreaktion mehr gibt, dann in einen Kolben filtriert und der Äther durch gelindes Erwärmen verdampft. Der so erhaltene Rückstand wird mit kleinen Portionen 15—20prozentigen Alkohols aufgenommen und die trübe Flüssigkeit erwärmt, bis sie klar wird, und heiß filtriert, wobei sich beim Erkalten die kristallinischen Verbindungen abscheiden.

Liegt eine einzelne Aminosäure vor, so kann sie durch die Bestimmung der physikalischen Konstanten, wie Schmelzpunkt, Löslichkeit, Kristallform, identifiziert werden. In den meisten Fällen besteht aber das Rohprodukt aus verschiedenen Verbindungen, und aus diesem Gemisch läßt sich das β -Naphthalinsulfoglyzin nach dem Verfahren von Abderhalden und Bergell isolieren. Das Gemenge der verschiedenen Naphthalinsulfoaminosäuren wird mit der zehnfachen Menge Wasser übergossen, mit Ammoniak tropfenweise versetzt, wobei Lösung eintritt, und auf dem Wasserbade so lange erwärmt, bis die Reaktion annähernd neutral ist. Die Lösung wird dann mit Bariumchlorid versetzt, das dadurch ausgeschiedene unlösliche Barytsalz des Naphthalinsulfoglykokolls abfiltriert, mit Wasser ausgewaschen, mit Salzsäure behandelt, um das freie Naphthalinsulfoglykokoll zu erhalten. Im Filtrate befinden sich die anderen freien Naphthalinsulfoaminosäuren, die man durch Zusatz von etwas Salzsäure und Extraktion mit Äther erhält und nach dem Verdunsten des Äthers aus warmem Wasser umkristallisiert. Um aus den erhaltenen Naphthalinsulfoaminosäuren die einzelnen Aminosäuren zu isolieren, behandelt man sie nach Wohlgemuth¹⁾ mit konzentrierter Salzsäure, kocht das so erhaltene Aminosäurengemisch mit Kupferkarbonat, wobei sich das schwerlösliche Leuzinkupfer oft schon beim Kochen oder beim Erkalten ausscheidet. Der aus Leuzinkupfer und Kupferkarbonat bestehende Niederschlag wird in Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff behandelt, wobei das Leuzin in Freiheit gesetzt und durch Eindampfen der wässrigen Lösung gewonnen wird. Wird nun das Filtrat vom Leuzin auf dem Wasserbade eingengt und erkalten gelassen, so kristallisiert zuweilen Alaninkupfer aus.

Nach der Ansicht von Embden und Reese²⁾ soll der Nachweis von Aminosäuren nur dann gelingen, wenn der Harn nicht eben, sondern stark alkalisch gemacht wird, nachdem der Harn mit so viel Alkali versetzt worden ist, daß blaues Lackmuspapier eben nicht gerötet wurde (auf den Liter Harn 20—40 ccm Normalnatronlauge). Nach Neuberg und Wohlgemuth³⁾ ist es bei der stark alkalischen Reaktion durchaus nicht ausgeschlossen, daß die Aminosäuren, die man hierdurch gewinnt, nicht präformiert im Harn vorhanden sind, sondern sekundär durch Abspaltung aus höheren Verbindungen.

α -Naphthylisozyanatmethode. Diese von Neuberg und Manasse³⁾ vorgeschlagene Methode eignet sich sehr gut zum Nachweis von Aminosäuren, weil deren α -Naphthylisozyanatverbindungen kristallinisch und sehr schwer löslich sind; außerdem ist das α -Naphthylisozyanat flüssig und bedarf daher im Gegensatz zu dem β -Naphthalinsulfochlorid keines besonderen Lösungsmittels.

Man versetzt den Harn mit Natron- oder Kalilauge bis zur schwach alkalischen Reaktion, fügt das Reagens hinzu, schüttelt das Gemisch im verschlossenen Gefäß mehrmals (jedesmal 3 Minuten) um, wobei man den Stopfen nach jeder Schüttelung lüftet, da kein großer Überschuß von Natronlauge angewendet wird und der Überschuß des Zyanats unter Kohlensäureentwicklung und Bildung von Dinaphthylharnstoff stattfindet, und läßt etwa 1 Stunde stehen, wobei folgende Reaktion stattfindet:



Nachdem die Umsetzung sich vollzogen hat, filtriert man von dem ganz unlöslichen Dinaphthylharnstoff ab und säuert das Filtrat an, wonach die α -Naphthylhydantoinsäuren in kristallinischer Form ausfallen; sie können aus verdünntem Alkohol ausfallen.

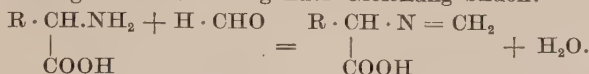
¹⁾ Wohlgemuth, Zeitschr. f. physiol. Chemie **44**, 80 (1905).

²⁾ G. Embden und H. Reese, Über die Gewinnung von Aminosäuren aus normalem Harn. Hofmeisters Beiträge **7**, 44 (1905).

³⁾ C. Neuberg und Wohlgemuth, Medizinische Klinik **1906**, 227.

Quantitative Bestimmung der Aminosäuren nach Henriques und Sörensen.¹⁾

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß, wenn man eine Aminosäurelösung mit einer neutralisierten Formaldehydlösung versetzt, sich das Formalin mit der Aminogruppe unter Wasserabspaltung vereinigt, wobei sich Methylenverbindungen im Sinne folgender Gleichung bilden:



und die vorhandenen Karboxylgruppen sich titrimetrisch bestimmen lassen.

Erforderliche Lösungen. a) Eine Lösung von 0,5 g Phenolphthalein in 50 ccm Alkohol + 50 ccm Wasser.

b) $\frac{1}{5}$ -Normalbarytlauge und $\frac{1}{5}$ -Normalsalzsäure.

c) Eine Formolmischung, die für jede Versuchsreihe frisch dargestellt werden muß. 50 ccm käufliches Formol (30—40prozentig) werden mit 1 ccm Phenolphthaleinlösung und danach mit $\frac{1}{5}$ -Normalbarytlauge bis zum ganz schwachen rosa Farbenton versetzt.

d) Als Kontrolllösung werden 20 ccm ausgekochtes destilliertes Wasser benutzt.

50 ccm Harn werden in einem 100 ccm fassenden Kolben mit 1 ccm Phenolphthaleinlösung, 2 g festem Bariumchlorid versetzt. Zu dieser Lösung fügt man nach dem Umrühren eine gesättigte Lösung von Bariumhydroxyd bis zur roten Farbe und dann zur Entfernung der Phosphate noch 5 ccm, füllt auf 100 ccm auf, schüttelt gut durch und filtriert nach 15 Minuten langem Stehen durch ein trocknes Filter. Hierauf werden 80 ccm des Filtrates (entsprechend 40 ccm Harn) in einen 100 ccm fassenden Meßkolben gebracht, $\frac{1}{5}$ -Normalsalzsäure bis zur neutralen Reaktion mit Lackmuspapier hinzugesetzt und bis zur Marke aufgefüllt. Nun wird in gleichen aliquoten Teilen, etwa 40 ccm der Neutrallösung entsprechend 16 ccm Harn, einerseits das Ammoniak, andererseits die Stickstoffmenge nach der Formoltitrierung bestimmt, die in folgender Weise ausgeführt wird.

Zuerst wird die Kontrolllösung mit 10 ccm Formolmischung, etwa 5 ccm Barytlauge versetzt und mit $\frac{1}{5}$ -Normalsalzsäure zurücktitriert. Bei dieser Rücktitrierung wird die Salzsäure unter Schütteln zugetropft, bis die Flüssigkeit nur einen schwachen Rosafarbenton hat (erstes Stadium), darauf wird 1 Tropfen Barytlauge zugesetzt, wodurch die Kontrolllösung eine deutliche rote Farbe annimmt (zweites Stadium). Die zur Untersuchung vorliegende Lösung wird bis zu dieser letzten Farbenstärke titriert, indem den 40 ccm 10 ccm Formolmischung und $\frac{1}{5}$ -Barytlauge bis zur Rotfärbung und noch ein paar Kubikzentimeter der Lauge zugesetzt werden und mit $\frac{1}{5}$ -Normalsalzsäure zurücktitriert, bis die Farbe der Lösung schwächer als die der Kontrolllösung erscheint, und schließlich wird Barytlauge zugetropft, bis die Farbe der Kontrolllösung wieder erreicht worden ist. Hierauf werden der Kontrolllösung weitere 2 Tropfen Barytlauge zugesetzt, wodurch diese eine stark rote Farbe annimmt. Die Titrierung der Analyse führt man zu Ende, indem man zu der Lösung so viel Barytlauge zutropft, bis die stark rote Farbe der Kontrolllösung erreicht ist (Phenolphthalein, drittes Stadium). Die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter $\frac{1}{5}$ -Normalbarytlauge mit 2,8 multipliziert, gibt die Stickstoffmenge in Milligrammen an, die nach Abzug des Ammoniakstickstoffs der Menge des Aminosäurenstickstoffs entspricht.

Harnstoff, Kreatin, Kreatinin verhalten sich wie vollständig neutrale Stoffe, auch die Gegenwart von Hippursäure übt keinen Einfluß aus. Sind Polypeptide im Harn vorhanden, so erniedrigt sich die Menge des Aminosäurenstickstoffs, je mehr Aminosäuren miteinander verbunden sind. Durch Formoltitrierung vor und nach dem Kochen mit starker Salzsäure kann man feststellen, ob Polypeptide im Harn vorhanden sind ²⁾.

¹⁾ V. Henriques, Über quantitative Bestimmung der Aminosäuren im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie **60**, 1 (1909). — S. Sörensen, Enzymstudien. Biochem. Zeitschr. **7**, 45 (1908).

²⁾ V. Henriques und S. P. Sörensen, Über die quantitative Bestimmung der Aminosäuren, Polypeptide und der Hippursäure im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie **63**, 27 (1909).

Nach Malfatti¹⁾ lassen sich die Aminosäuren direkt im Harn bestimmen, wenn man das Ammoniak im Harn zuerst fällt. Man versetzt 50 ccm Harn mit 2—4 g Quecksilberchlorid und gepulvertem kohlensauren Natrium in kleinen Portionen bis zur alkalischen Reaktion mit Lackmuspapier, wobei sich ein Niederschlag ausscheidet. Dieser wird abfiltriert, das Filtrat mit einigen Tropfen Essigsäure versetzt und mit Schwefelwasserstoff bis zur Entfernung des Quecksilbers behandelt. Das Filtrat vom ausgeschiedenen Quecksilbersulfid wird durch Kochen von der Kohlensäure und dem Schwefelwasserstoff befreit und mit Formol titriert.

In ammoniakreichem Harn bestimmen Henriques und Sörensen²⁾ die Aminosäuren, indem sie in 80 ccm des Filtrates, entsprechend 40 ccm Harn (s. oben), das Ammoniak im Vakuum abdestillieren, den Destillationsrückstand in einigen Kubikzentimetern annähernd normaler Salzsäure lösen, die etwa vorhandene Kohlensäure durch einen kohlensäurefreien Luftstrom verjagen, die salzsaure Flüssigkeit in einem Kolben von 100 ccm Inhalt unter Nachspülen mit kohlensäurefreiem, destilliertem Wasser überführen, mit normaler Natronlauge und Lackmuspapier als Indikator genau neutralisieren und mit kohlensäurefreiem Wasser zur Marke auffüllen. Die in 40 ccm der neutralen Lösung entsprechend 16 ccm Harn ausgeführte Formoltitration gibt direkt den Gehalt an Aminosäurenstickstoff, da die Lösung ammoniakfrei ist.

Eine direkte Isolierung mancher Aminosäuren aus dem Harne ist nach Abderhalden bei den in Wasser schwer löslichen Tyrosin, Leuzin, Zystin und Aminovaleriansäure möglich. Zu diesem Zweck verdünnt man den Harn mit der zehnfachen Menge Wasser, versetzt mit einem großen Überschuß an basischem Bleiazetat, wodurch ein Niederschlag entsteht, von dem man abfiltriert und das Filtrat vom gelösten Blei durch Schwefelwasserstoff befreit und letzteren durch einen Luft- oder Kohlensäurestrom verjagt. Beim Eindampfen des Filtrates kristallisieren Tyrosin und Leuzin aus, wenn sie in größeren Mengen vorhanden sind. Die Gegenwart des Tyrosins läßt sich durch die Millonsche Reaktion feststellen, und dessen Trennung vom Leuzin kann man durch fraktionierte Kristallisation erzielen; 1 Teil Tyrosin löst sich in 2454 Teilen Wasser von 20° C. Aus der Mutterlauge läßt sich das Leuzin als Kupfersalz durch Versetzen mit frisch gefälltem Kupferoxyd, wobei eine schwachblaue Trübung entsteht, gewinnen. Nach dem Erkalten der filtrierten Lösung scheidet sich das Leuzinkupfer in Form blaßblauer, fast weißer Blättchen aus. Der Kupferoxydrückstand wird so lange mit Wasser ausgekocht, bis die Lösung farblos wird. Ist Aminovaleriansäure zugegen, so können die Kupfersalze beider Aminosäuren durch fraktionierte Kristallisation nicht voneinander getrennt werden, und man bedient sich, im Falle man entscheiden will, ob Leuzin oder Aminovaleriansäure zugegen ist, ihres Drehungsvermögens — Leuzin zeigt, in 20-prozentiger Salzsäure gelöst, eine spezifische Drehung von +15,9°, Aminovaleriansäure +28,8°.

Leuzin und Tyrosin können auch durch ihre verschiedene Löslichkeit in siedendem Eisessig getrennt werden, da das Leuzin sehr leicht, das Tyrosin dagegen außerordentlich schwer in diesem Lösungsmittel löslich ist. Aus der filtrierten Eisessiglösung gewinnt man nach dem Verdunsten des Eisessigs das Leuzin und identifiziert es durch Überführung in das Kupfersalz, oder durch Herstellung des Leuzinphenylhydantoins oder einer anderen schwerlöslichen Verbindung.

Zystin kann ebenfalls direkt aus dem Harn gewonnen werden, indem man den mit basischem Bleiazetat behandelten Harn eindampft, mit Eisessig im Überschuß versetzt und bei gewöhnlicher Temperatur 24—48 Stunden

¹⁾ H. Malfatti, Die Formoltitrierung der Aminosäuren im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie **61**, 499 (1909).

²⁾ V. Henriques und S. P. Sörensen, Zeitschr. f. physiol. Chemie **64**, 132 und 134 (1909).

stehen läßt, wobei sich Zystin ausscheidet. Dieses wird in 10prozentigem Ammoniak gelöst und die Lösung vorsichtig mit so viel Eisessig versetzt, daß die Reaktion noch schwach alkalisch bleibt. Bei Gegenwart von Tyrosin tritt keine Fällung ein, man übersättigt dann mit Eisessig, löst in Ammoniak und fällt mit Eisessig. Durch Wiederholung dieser Manipulation wird das Zystin rein erhalten.

Goldmann und Baumann¹⁾ isolieren das Zystin aus dem Harn als Benzoylzystin. Zu diesem Zwecke wird die Tagesmenge Harn mit 200 bis 250 ccm einer 10prozentigen Natronlauge und 20—25 ccm Benzoylchlorid versetzt und geschüttelt, bis der Geruch nach Benzoylchlorid verschwunden ist, und filtriert. Das Filtrat versetzt man mit Schwefelsäure bis zur sauren Reaktion, schüttelt dreimal mit dem gleichen Volumen Äther aus, destilliert den Äther ab, neutralisiert den Rückstand mit Natronlauge, versetzt mit 3—4 fachem Volumen 12prozentiger Natronlauge und läßt in der Kälte stehen, wobei sich das Natriumsalz des Benzoylzystins in Form von Nadeln und Plättchen ausscheidet. Diese werden auf einem Filter mit wenig kalter Natronlauge und dann mit Wasser gewaschen, wobei das Benzoylzystin in Lösung geht, aus der es durch Salzsäurezusatz gefällt wird.

Quantitative Bestimmung. Die von Gaskell²⁾ ausgearbeitete Methode beruht auf der Unlöslichkeit des Zystins in Azeton. Das Zystin scheidet sich oft schon teilweise beim Stehen des sauren Harnes aus. Die Bestimmung zerfällt dann in zwei Teile: man filtriert von den ausgeschiedenen Kristallen ab, die man umkristallisiert, und bearbeitet dann das Filtrat.

Die ausgeschiedenen Kristalle werden mit wenig kaltem Wasser gewaschen, wobei das Wasser mit dem Hauptfiltrat nicht zusammengebracht werden darf, in 2½prozentigem Ammoniak gelöst, mit dem gleichen Volumen Azeton und mit Essigsäure bis zur sauren Reaktion versetzt und 3—4 Tage stehen gelassen, wobei das Zystin auskristallisiert. Die Kristalle bringt man auf ein getrocknetes und gewogenes Filter, wäscht sie mit Wasser aus, trocknet bei 80° C und wägt nach dem Erkalten im Exsikkator.

Das Filtrat von den zuerst ausgeschiedenen Zystinkristallen wird mit Ammoniak bis zur deutlich alkalischen Reaktion und mit Kalziumchlorid versetzt, wodurch die Hauptmengen der Oxalate und Phosphate entfernt werden. Das Filtrat wird mit dem gleichen Volumen Azeton versetzt und mit Essigsäure schwach sauer gemacht. Nach 3—4 Tagen kristallisiert alles Zystin aus, das man durch Lösen in Ammoniak und Fällen mit Azeton und Essigsäure reinigt und nach dem Trocknen wägt.

Indirekt kann man das Zystin in der Weise bestimmen, daß man in einer Portion Harn den Gesamtschwefel und in einer anderen die Gesamtschwefelsäure nach den S. 123 angegebenen Methoden ermittelt und auf solche Weise erfährt, wieviel Prozent des Gesamtschwefels nicht in Form von schwefelsauren und ätherschwefelsauren Salzen vorliegt; unter normalen Verhältnissen beträgt diese Quantität etwa 17,2 Proz. des Gesamtschwefels. Zieht man diesen Wert von dem gefundenen ab, so erhält man diejenige Schwefelmenge, die dem Zystin entspricht.

26. Organische Harnbasen.

a) Ätherlösliche Harnalkaloide.

1. Verfahren von Luff-Griffiths, modifiziert von Albu³⁾. 8—10 Liter Harn werden mit kohlensaurem Ammonium stark alkalisch gemacht und mit

¹⁾ E. Goldmann und E. Baumann, Zur Kenntnis der schwefelhaltigen Verbindungen des Harnes. Zeitschr. f. physiol. Chemie **12**, 254 (1888).

²⁾ J. F. Gaskell, A method of quantitative estimation of cystin in urine. Journ. of physiol. **36**, 143 (1907).

³⁾ A. T. Luff, Eine neue Methode zur Extraktion von Ptomainen, London 1888. — A. B. Griffiths, Ein aus Urin in einem Falle infektiöser Krankheit ausgezogenes Ptomain. Chem. news **61**, 87 (1890). Ptomaine aus dem Urin in einigen Infektionskrankheiten. Compt. rend. de l'Académie des sc. **113**, 656 (1891); **114**, 496, 1382; **115**, 185, 667 (1892); **116**, 1205; **117**, 744 (1893); **118**, 1350 (1894); **120**, 1128 (1895).

dem halben Volumen Äther ausgeschüttelt, wobei eine einmalige Ausschüttelung genügt, um die Gesamtmenge der Basen zu extrahieren. Nachdem sich die beiden Flüssigkeiten voneinander getrennt haben, schüttelt man die ätherische Schicht mit dem zehnten Teil einer 5prozentigen Weinsäurelösung, um ihr das Alkaloid zu entziehen. Man trennt nun die wässrige weinsaure Lösung vom Äther ab, verjagt aus ihr die letzten Spuren von Äther, macht mit Natriumkarbonat alkalisch, wodurch die Alkaloide wieder in Freiheit gesetzt werden und schüttelt mit dem halben Volumen Äther. Die ätherische Schicht trennt man von der wässrigen Flüssigkeit, läßt den Äther verdunsten, trocknet über Schwefelsäure, wobei die Basen sich kristallinisch scheiden und aus Wasser und Alkohol umkristallisiert werden können.

2. Verfahren von Brieger¹⁾. Nicht weniger als 10 Liter mit Salzsäure schwach angesäuerten Harnes werden auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz eingedampft, der Sirup mit absolutem Alkohol aufgenommen, die alkoholische Lösung vom Ungelösten abfiltriert, eingengt und wieder mit absolutem Alkohol aufgenommen. Das klare Filtrat wird mit einer Quecksilberchloridlösung gesättigt und zur vollständigen Abscheidung des Niederschlages stehen gelassen. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit einer gesättigten Sublimatlösung gut gewaschen, in heißem Wasser gelöst, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, vom Quecksilbersulfid abfiltriert und das Filtrat bis zur Trockne eingedampft, wobei die Chlorhydrate der Basen zurückbleiben, aus denen die Basen durch Fällung mit Phosphorwolframsäure oder Phosphormolybdänsäure und Überführung in gut kristallinische Verbindungen, wie die Platin- resp. Goldchloriddoppelsalze, erhalten werden.

Diese Methode eignet sich nur für eine bestimmte Zahl von Harnbasen, da ein großer Teil der organischen Basen sich überhaupt nicht in wässriger oder alkoholischer salzsaurer Lösung mit Quecksilberchlorid zu schwerlöslichen Verbindungen überführen läßt.

3. Verfahren von Kutscher und Lohmann²⁾. Man saugt 100 Liter normalen, spermatozoenfreien Frauenharn durch mit Kieselgur bedeckte Nutschen ab, um die Bestandteile der Nubekula zu entfernen, versetzt das Filtrat mit so viel konzentrierter Salzsäure bis es ungefähr 3 Proz. freie Salzsäure enthält, und fällt mit Phosphorwolframsäurelösung, bis eine Probe, mit Phosphorwolframsäure versetzt, 1 Minute klar bleibt und läßt 24—48 Stunden stehen. Den abfiltrierten Niederschlag wäscht man mit 5prozentiger Schwefelsäure chlorfrei, suspendiert ihn in Wasser und versetzt ihn mit heißer gesättigter Barytlösung, wobei man dafür Sorge trägt, daß sich die ganze Flüssigkeit nicht über 30° C erwärmt. Die in Freiheit gesetzten Basen werden von den Bariumwolframatens abgesaugt, diese durch dreimaliges Auskochen mit Wasser gewaschen, das mit dem Waschwasser vereinigte Filtrat durch Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit, die filtrierte Lösung auf 1 Liter eingedampft und mit ausgekochter Salpetersäure angesäuert, bis Kongopapier schwach rot gefärbt wird, wodurch sich das Urochrom in harzigen Flocken abscheidet. Die filtrierte Lösung versetzt man mit einer 20prozentigen Silbernitratlösung, um die Purinbasen als Silberverbindung abzuscheiden, die man nach 12 Stunden absaugt. Zur weiteren Untersuchung bringt man die so erhaltenen Silbernitratverbindungen der Purinbasen auf einige Tage in schwache Ammoniaklösung, überführt sie in die Silberverbindungen und verarbeitet sie nach dem Verfahren von Krüger und Salomon.

Das Filtrat vom Purinbasenniederschlag versetzt man mit 20prozentiger Silbernitratlösung, bis eine Probe, in gesättigtes Barytwasser gebracht, einen sich sofort bräunenden Niederschlag bildet. Hierauf scheidet man durch vorsichtigen Zusatz von kalt gesättigtem Barytwasser unter Kontrolle von ammoniakalischer Silberlösung (bereitet durch Versetzen einer 10prozentigen Silbernitratlösung mit so viel einer 10prozentigen Ammoniaklösung, bis sich der

¹⁾ L. Brieger, Die Ptomaine. Berlin 1885/86. — Albu, Über die Darstellung von Toxinen aus dem Harn bei akuten Infektionskrankheiten. Über die Ausscheidung toxischer Substanzen bei akuten und chronischen Krankheiten. Berliner klin. Wochenschr. 31, 8 und 1081 (1894).

²⁾ Kutscher und Lohmann, Der Nachweis toxischer Basen im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie I, II, III, 48, 1 und 422; 49, 81 und 88 (1906). — Kutscher, Der Nachweis toxischer Basen im Harn, IV. Zeitschr. f. physiol. Chemie 51, 457 (1907).

zunächst ausfallende Niederschlag von Silberoxyd gerade gelöst hat, und Hinzufügen von noch einem Tropfen Ammoniak) Substanzen mit dem Imidazolkern und das Kreatinin. Man verfährt dabei in folgender Weise: Nachdem man sich an einer kleinen Probe der von Purinbasen befreiten Flüssigkeit überzeugt hat, daß diese auf Zusatz von Ammoniak eine weiße, in überschüssigem Ammoniak und in Salpetersäure lösliche Fällung liefert, versetzt man die ganze Flüssigkeit mit kleinen Portionen kalt gesättigten Barytwassers und läßt den sich bildenden Niederschlag absetzen. Von der darüber stehenden Flüssigkeit bringt man einen Tropfen auf eine Glasplatte und läßt ihn hier mit einem Tropfen der ammoniakalischen Silberlösung zusammenfließen. Zeigt sich an der Berührungsstelle der beiden Flüssigkeiten keine Trübung mehr, so ist die Fällung der auch durch Silbernitrat und Ammoniak fällbaren Körper beendet.

Der so erhaltene Silberniederschlag II enthält hauptsächlich Kreatinin, das man in folgender Weise entfernt: Man verreibt den Niederschlag mit kaltem gesättigten Barytwasser, wodurch ein großer Teil des Kreatininsilbers zersetzt wird, saugt den Rückstand ab, löst ihn in verdünnter Salpetersäure und fällt die Lösung durch Sättigen mit festem, gepulvertem Baryt. Diese Lösung und Fällung wird ein- oder zweimal wiederholt. Die so restierenden Silberverbindungen enthalten die Hauptmasse der die Diazoreaktion gebenden Basen, die man auf Histidin verarbeiten kann. Dazu löst man den kreatininfreien Niederschlag in Salpetersäure, fügt noch etwas Silbernitrat hinzu, fällt vorsichtig mit Ammoniak, saugt den flockigen Niederschlag ab, wäscht ihn gut aus, versetzt ihn mit Salzsäure und versucht, die Chloride kristallinisch zu gewinnen. Zuweilen ist eine Reinigung über die Kadmiumverbindungen mit folgender Überführung in die Pikrolonate nötig, um zu kristallisierbaren Körpern zu gelangen. Gewöhnlich macht diese Fraktion große Schwierigkeiten. So hat Engeland einmal Histidin, ein anderes Mal Imidazolaminoessigsäure aus dem Harne statt Histidin gewonnen. Daneben finden sich noch andere wenig untersuchte Imidazolderivate, die mit dem Histidin die Eigenschaft gemein haben, durch Silbernitratlösung und Ammoniak niedergeschlagen zu werden.

Das Filtrat vom Silberniederschlag II wird mit Barytwasser weiter versetzt, so lange noch ein Niederschlag entsteht, wobei ein Barytüberschuß sorgfältig vermieden werden muß. Dieser Silberniederschlag III enthält die Reste des Kreatinins, Basen, die starke Diazoreaktion geben, und Methyl- resp. Dimethylguanidin. Die zwei Basen gewinnt man nach dem Verfahren von Achelis¹⁾, indem man den Niederschlag absaugt, mit gesättigtem Barytwasser wäscht, in verdünnter Schwefelsäure löst, die Lösung mit Schwefelwasserstoff sättigt, das ausgeschiedene Schwefelsilber abfiltriert, das Filtrat zur Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt versetzt, die abfiltrierte Lösung durch Kohlensäure vom Baryt befreit und einengt.

Das Filtrat vom Silberniederschlag II befreit man durch Salzsäure vom Silber, durch Schwefelsäure vom Baryt, säuert es mit Schwefelsäure an, fällt den Rest der Basen mit Phosphorwolframsäure aus, saugt nach 24 Stunden die Phosphorwolframate ab, wäscht mit 5prozentiger Schwefelsäure frei von Salpeter- und Salzsäure. Aus dem Niederschlage werden die freien Basen durch Zersetzen mit Baryt in oben angegebener Weise dargestellt, der überschüssige Baryt durch Kohlensäure entfernt, das Filtrat mit Salzsäure bis zur sauren Reaktion gegen Kongorot versetzt und auf dem Wasserbade bis zur beginnenden Kristallisation eingedampft. Nach dem Erkalten zieht man den Rückstand mit absolutem Alkohol aus, verdunstet den Alkohol bei mäßiger Temperatur, nimmt den Rückstand wieder mit Alkohol auf und wiederholt diese Operation so oft, bis man die Basen in einen mit Äthylalkohol glatt löslichen und einen darin unlöslichen resp. schwer löslichen Teil getrennt hat.

Der letztere besteht hauptsächlich aus Kaliumchlorid, etwas Ammoniumchlorid und salzsaurem Kreatinin; es können darin auch noch andere Harnbasen enthalten sein, deren Chloride in kaltem Alkohol schwer löslich sind, wie das Betain und Trigonellin. Um den Verlust derartiger Basen zu vermeiden, digeriert man den in Alkohol unlöslichen Rückstand mit Methylalkohol, der die Chloride der Basen löst, während er das Kaliumchlorid ungelöst zurückläßt. Die methylalkoholische Lösung wird eingengt und der Rückstand mit den Alkaloid-

¹⁾ Achelis, Über das Vorkommen von Methylguanidin im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 10 (1906/07).

reagenzien auf Basen untersucht. Der normale Menschenharn enthält nur Kreatinin.

Die äthylalkoholische Lösung der Chloride fällt man mit alkoholischer 20prozentiger Platinchloridlösung, filtriert den flockigen Niederschlag nach 48 Stunden, wäscht ihn mit absolutem Alkohol und kristallisiert ihn aus verdünnter Salzsäure um. Beim Einengen scheiden sich Kalium- und Ammoniumplatinchlorid ab, die abfiltriert werden; die Lösung wird mit Schwefelwasserstoff vom Platin befreit, da die übrigen Platinsalze sich gegenseitig in Lösung zu halten scheinen und zur weiteren Trennung der Harnbasen nicht eignen. Die so erhaltene Chloridlösung wird zum Sirup eingedampft und mit 30prozentiger Goldchloridlösung behandelt. Nach vollständiger Ausfällung läßt man das Ganze einige Tage stehen, gießt die Mutterlauge vom Niederschlage ab, löst diesen in heißer verdünnter Salzsäure und engt die Lösung der Aurate bei einer 70° C nicht übersteigenden Temperatur ein. Schon aus der heißen Flüssigkeit scheiden sich die kräftigen, sehr schwer löslichen Nadeln des Aurates vom Methylpyridylammoniumhydroxyd aus. Beim weiteren Einengen gelingt es, das Aurat einer zweiten Base, des „Gynesins“, auszukristallisieren.

Um die beiden Aurate voneinander zu trennen, wird die Gesamtmenge der Aurate auf etwa 100 ccm eingengt und einige Tage in der Kälte bedeckt stehen gelassen, bis sich alle Kristalle ausgeschieden haben. Die hauptsächlich aus den Auraten des Methylpyridylammoniumhydroxyds und des Gynesins bestehenden Kristalle werden abgesaugt, in verdünnter heißer Salzsäure gelöst und bei 70° C auf etwa 150 ccm eingedampft, wobei sich das auch in der Wärme schwer lösliche Aurat des Methylpyridylammoniumhydroxyds fast vollständig ausscheidet. Aus der Mutterlauge scheidet sich bei weiterem Einengen das in der Wärme leicht und in der Kälte schwer lösliche Aurat des Gynesins aus, das man durch Umkristallisieren von den Resten des anderen Aurates befreien kann.

Die die leichter löslichen Aurate enthaltende Mutterlauge wird stark eingengt, wobei die Aurate als Öl ausfallen, das man beim Ausbleiben der Kristallisation in verdünnter Salzsäure löst, das Gold mit Schwefelwasserstoff entfernt, die so erhaltene Chloridlösung bis zum Sirup eindampft und mit kaltem absoluten Alkohol aufnimmt, wobei ein schwerlösliches Chlorid des von Kutscher genannten Mingins zurückbleibt. Dieses kann in das Aurat umgewandelt werden.

Die alkohollöslichen Chloride fällt man mit gesättigter alkoholischer Sublimatlösung, saugt den Niederschlag ab, wäscht ihn mit alkoholischer Sublimatlösung aus, zersetzt ihn mit Schwefelwasserstoff und erhält die Chloride, die sich in gut kristallisierende Aurate überführen lassen. Auf diese Weise gelang es, das „Reduktonovain“ aus Menschenharn und das γ -Methylpyridin¹⁾ aus Pferdeharn zu erhalten.

Verdunstet man das Filtrat der Sublimatfällung, löst den Rückstand in Wasser, entfernt das Quecksilber durch Schwefelwasserstoff und führt die durch Sublimat nicht gefällten Chloride wieder in die Aurate über, so kristallisieren diese, nachdem das Gemenge durch Alkohol und Sublimat einigermaßen zerlegt worden ist, un des gelang Kutscher, auf diese Weise das „Vitiatin“ aus dem Menschenharn darzustellen.

Verfahren von Engeland²⁾. a) Fällung mit gesättigter Sublimat- und Natriumazetatlösung. Man versetzt 24 Liter Menschenharn mit gesättigter wässriger Sublimat- und Natriumazetatlösung, so lange noch ein Niederschlag entsteht, läßt einige Tage stehen, saugt den Niederschlag ab, wäscht ihn mit Sublimat- und Natriumazetatlösung, erwärmt mit verdünnter Salzsäure auf dem Wasserbade, wobei ein Teil in Lösung geht, filtriert, entfernt aus dem Filtrat das Quecksilber durch Schwefelwasserstoff und dampft die Lösung der Chloride auf dem Wasserbade bis zur beginnenden Kristallisation ein. Der Rückstand wird mit Methylalkohol aufgenommen, die Lösung von den zurückgebliebenen anorganischen Salzen abfiltriert, vom Methylalkohol durch Erwärmen befreit, der Rückstand mit kaltem Äthylalkohol digeriert, wobei

¹⁾ Achelis und Kutscher, „Nachweis organischer Basen im Pferdeharn. Zeitschr. f. physiol. Chemie 52, 91 (1907).

²⁾ R. Engeland, Über den Nachweis organischer Basen im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie 57, 48 (1908). Die Diazoreaktion des normalen Harns. Münchn. mediz. Wochenschr. 1908, Nr. 31.

Kreatininchlorid und Ammoniumchlorid ungelöst bleiben. Nun versetzt man die äthylalkoholische Lösung mit 20prozentiger alkoholischer Platinchloridlösung, wobei hauptsächlich Kreatininplatinat ausfällt, während in Lösung eine Base zurückbleibt. Das Filtrat wird vom Platin durch Schwefelwasserstoff befreit, bis zur Sirupkonsistenz eingedampft und mit 30prozentiger Goldchloridlösung versetzt, wodurch nach längerem Stehen sich das Aurat des asymmetrischen Dimethylguanidins in großen gelben Tafeln und festen Krusten abscheidet.

b) Fällung nach vorangehender Konzentration und Reinigung mit Tannin. 28 Liter Harn werden auf $\frac{1}{3}$ des Volumens eingedampft, mit 20prozentiger Tanninlösung bei saurer Reaktion versetzt, von dem ausgeschiedenen Niederschlag dekantiert, die Flüssigkeit durch Versetzen mit Barytwasser vom überschüssigen Tannin, mit Schwefelsäure vom Baryt und mit Bleioxyd von der Schwefelsäure und dem Rest des Tannins befreit. Die auf etwa 10 Liter gebrachte Flüssigkeit wird mit heißer gesättigter Sublimat- und Natriumazetatlösung gefällt, bis eine abfiltrierte Probe auf weiteren Zusatz des Fällungsmittels keinen Niederschlag mehr gab. Der Niederschlag wird in der unter I angegebenen Weise behandelt, mit dem Unterschiede, daß die in Methylalkohol löslichen Chloride wiederholt mit Äthylalkohol aufgenommen werden, bis sie sich nicht ganz glatt auch in kaltem Äthylalkohol lösen. Der Äthylalkohol wird nun verjagt und der Rückstand mit 30prozentiger wässriger Goldchloridlösung versetzt, wobei sich nach einigem Stehen ein reichlicher kristallinischer Niederschlag von Methylguanidinaurat ausscheidet.

c) Unmittelbare Fällung mit heißgesättigter Sublimat- und Natriumazetatlösung. 40 Liter Menschenharn versetzt man abwechselnd mit heißer gesättigter Sublimat- und Natriumazetatlösung so lange, bis eine filtrierte Probe mit einem Überschuß der kalt gesättigten Fällungsmittel auch beim Stehen keine Trübung mehr gibt, und läßt einige Tage stehen. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit einem Gemisch von kalt gesättigter Sublimat- und Natriumazetatlösung gewaschen und wie unter I behandelt. Die dargestellten Chloride werden mit Äthylalkohol aufgenommen, bis man eine auch in Äthylalkohol leicht lösliche Masse erhält, und mit 20prozentiger Platinchloridlösung gefällt. Der Platinniederschlag wird in heißem Wasser gelöst, vom schwerlöslichen Ammoniumplatinat abfiltriert, das Platin aus dem Filtrat mit Schwefelwasserstoff entfernt und die bis zum Sirup eingeeengte Lösung der Chloride mit 30prozentiger Goldchloridlösung versetzt und stehen gelassen, wobei nach einigen Tagen zuerst eine Verbindung kristallisiert, die dem Vitiatin nahekommt, dann scheidet sich ein sehr leicht lösliches Goldsalz von der Formel $C_{15}H_{28}N_6O_{13} \cdot HC \cdot 1AuCl_3$ aus. Das Chlorid dieses Körpers gibt die Biuret-, die Diazo- und die Knoopsche Reaktion, die Millonsche fällt negativ aus.

Das Filtrat der Platinfällung wird nach Verjagen des Alkohols vom Platin befreit, die Chloride zum Sirup eingeengt und mit 30prozentiger Goldchloridlösung versetzt, nach einigem Stehen kristallisiert Methylguanidinurat.

Die Mutterlauge des Methylguanidinurats befreit man vom Gold durch Schwefelwasserstoff, dampft die Chloride zum Sirup ein, den man dann mit absolutem Alkohol aufnimmt und mit feingepulvertem Kadmiumchlorid bis zur Sättigung versetzt, wobei sich eine voluminöse Fällung (Kadmiumfällung I) bildet, die man abfiltriert. Das Filtrat gibt auf Zusatz alkoholischer Natriumazetatlösung wieder eine reichliche Fällung (Kadmiumfällung II). Die beiden Fällungen werden zusammen in Wasser gelöst, mit Schwefelwasserstoff vom Kadmium befreit, das Filtrat durch wiederholtes Abdampfen mit Alkohol möglichst von überschüssiger Salzsäure befreit, deren Rest aber durch Silbernitrat entfernt. Zu dem so erhaltenen Filtrat fügt man so viel Silbernitrat hinzu, daß eine Probe mit Barytlösung sofort einen braunen Niederschlag gibt, versetzt dann mit Ammoniak, bis sich eine Probe mit ammoniakalischer Silberoxydlösung nicht mehr trübt. Die entstandene Fällung wird abfiltriert, mit Wasser gut gewaschen, mit heißer verdünnter Salzsäure versetzt, vom ausgeschiedenen Chlorsilber abfiltriert und das Filtrat mehrmals mit konzentrierter Salzsäure auf dem Wasserbade abgedampft, um die Salpetersäure vollständig zu entfernen. Aus der mit Tierkohle gereinigten Lösung wird durch Einengen Histidinchlorid gewonnen, das man durch Waschen mit Salzsäure und Alkohol rein weiß erhält. Das Chlorid führt man durch Fällung mit alkoholischer Pikrolonsäure in das gut kristallisierende Pikrolonat über.

b) Amine.

1. Monoamine.

a) Methylamin CH_5N $\text{CH}_3 \cdot \text{NH}_2$.

Eigenschaften. Das Methylamin stellt ein stark ammoniakalisch riechendes Gas, das sich leicht entzündet und mit gelber Flamme brennt, dar. Es löst sich leicht in Wasser, verhält sich im übrigen wie Ammoniak. Mit Neßlers Reagens gibt es einen Niederschlag, der im Unterschied von Dimethyl- und Trimethylamin in überschüssigem Wasser und im Überschuß des Reagenses unlöslich ist.

Nachweis. Das Destillat der Ammoniakbestimmung wird schwach angesäuert, bis auf 5—10 ccm eingedampft, der Rückstand mit 25 ccm einer gesättigten alkoholischen Kaliumkarbonatlösung und ein paar Tropfen Chloroform versetzt und aufgekocht, wobei in Gegenwart von Methylamin der widerliche Geruch von Isonitril auftritt, der sich bei weiterem Kochen und nach dem Erkalten besonders bemerkbar macht.

Quantitative Bestimmung. Im Destillate der Ammoniakbestimmung wird zunächst die Gesamtmenge des Ammoniaks und der Amine durch Titration ermittelt, wobei man gewöhnlich so viel Harn anwendet, daß das Destillat nicht weniger als 30 mg N enthält. Die titrierte Flüssigkeit bringt man dann in einen 500 ccm fassenden Kolben, versetzt sie mit 5—10 ccm einer alkalischen, aus 20 Proz. Natriumhydroxyd und 30 Proz. Natriumkarbonat bestehenden Lösung, füllt den Kolben mit Wasser, fügt 0,1 g gelbes Quecksilberoxyd pro 1,4 mg Stickstoff zu, schüttelt die Mischung eine Stunde lang im Dunkeln und läßt dann 12 Stunden stehen, wobei das Quecksilberoxyd das Ammoniak, aber nicht die Amine absorbiert. Den sich dabei bildenden Niederschlag filtriert man ab und verwendet 250 ccm des Filtrates zur Titration; man erfährt dann die Menge der Amine.

Dimethylamin $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ $(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{NH}_2$.

Das salzsaure Salz des Dimethylamins löst sich in Chloroform, das salzsaure Methylamin ist unlöslich.

Das Platinsalz $2[(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{NH} \cdot \text{HCl}] \cdot \text{PtCl}_4$ bildet rhombische Kristalle.

b) Trimethylamin $\text{C}_3\text{H}_9\text{N}$. $(\text{CH}_3)_3 \cdot \text{N}$.

Eigenschaften. Das Trimethylamin ist ein ammoniakalisch und durchdringend fischartig riechendes Gas, das unter $+3^\circ \text{C}$ flüssig ist; in Wasser, Alkohol und Äther ist es löslich. Mit Säuren verbindet es sich zu Salzen, die in Wasser leicht löslich sind.

Nachweis. Nach Takeda ¹⁾ bringt man 1 Liter des zu untersuchenden Harnes in den Kolben A (Fig. 44) und fügt 100 ccm Alkohol und 400 ccm Kalkmilch oder 8—10 g Magnesiumoxyd hinzu. Das Wasserbad, in dem der Kolben A steht, wird auf 40°C erwärmt, die Klemmschraube *k* geschlossen und der Druck im ganzen System mittels der Wasserstrahlpumpe auf 35 mm Hg gebracht. Bei starkem Schäumen lockert man zuweilen die Klemmschraube *k*, wobei ein wenig Luft nach A eintreten kann, die dann das Übertreten des Schaumes in das Gefäß B verhindert. Sobald die Flüssigkeit ruhig und ohne Schaumbildung

¹⁾ Takeda, Der Nachweis von Trimethylamin im Harn. Pflügers Archiv 129, 82 (1909).

siedet, schließt man *k*. Zum Schluß des Versuches saugt man durch *a*₁ noch 50 ccm Alkohol nach, die den Kolbeninhalt wieder in lebhaftes Sieden bringen. Nach Beendigung des Versuches wird das in den Vorlagen *B*, *C* und *C*₁ gesammelte Destillat sorgfältig in eine Schale gespült, zur Trockne verdampft und der Rückstand mit Alkohol ausgezogen. Aus der alkoholischen Lösung wird der Alkohol verjagt, der Rückstand in wenig verdünnter Salzsäure gelöst und mit 30 prozentiger Goldchloridlösung versetzt, wobei ein entstehender Niederschlag die Gegenwart von Trimethylamin zeigt. Um Trimethylamin vom Ammoniak zu trennen, läßt man beide Gase durch Wasser streichen, neutralisiert die Lösung mit verdünnter Schwefelsäure, dampft zur Trockne ein und nimmt den Rückstand mit absolutem Alkohol auf, in Lösung geht nur das Sulfat des Trimethylamins.

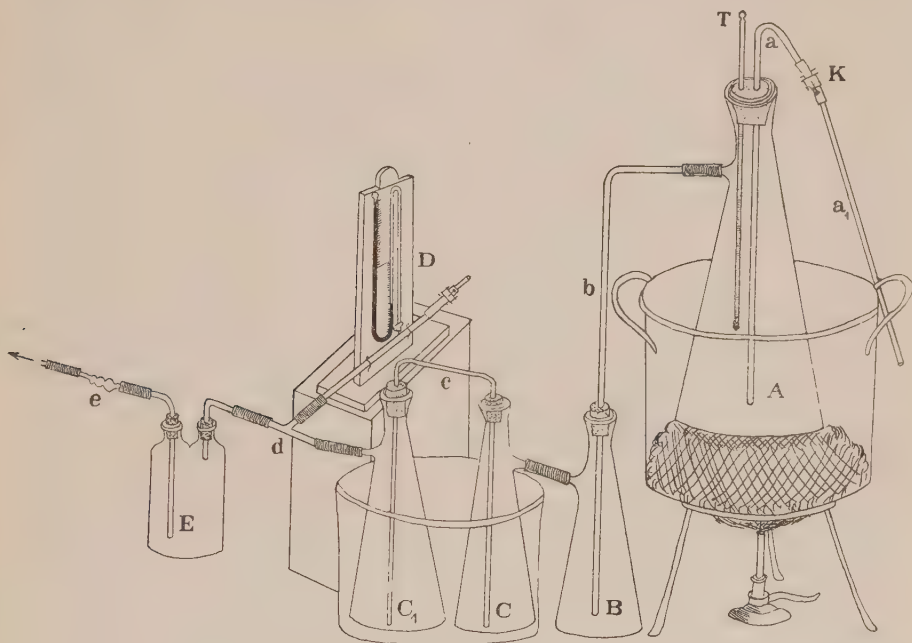


Fig. 44. Hager-Bonn.

Quantitative Bestimmung. Die von Filippi ¹⁾ angegebene Methode beruht auf der Eigenschaft des Ammoniaks und der primären und sekundären Amine, durch einen Überschuß an Natriumhypobromit quantitativ zerlegt zu werden, während das Trimethylamin nicht angegriffen wird, wenn die Einwirkung nicht zu lange dauert und der angewandte Überschuß sich beseitigen läßt, ohne daß das Trimethylamin dadurch verändert wird.

Die ganze Tagesmenge Harn wird in einen 2500—3000 ccm fassenden, mit 10—15 g Kalihydrat in Stücken und einigen Paraffinstückchen beschickten Kolben gebracht und mit dem Kühler verbunden. Das Péligotsche Rohr wird mit so viel verdünnter Salzsäure

¹⁾ F. de Filippi, Das Trimethylamin als normales Produkt des Stoffwechsels, nebst einer Methode für dessen Bestimmung im Harn und Kot. Zeitschr. f. physiol. Chemie **49**, 433 (1906).

beschiedt, daß die Glasperlen eben bedeckt sind, in die Vorlage bringt man 100—150 ccm auf $\frac{1}{3}$ verdünnte Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 und erhitzt zuerst langsam, läßt dann bei Beginn der Destillation die Flüssigkeit lebhaft sieden und hält deren Volumen durch Regulieren des Dampferzeugers annähernd konstant. Nachdem 1 Liter Destillat übergegangen ist und man sich überzeugt hat, daß das Destillat sauer reagiert, bringt man dieses und den Inhalt des Péligotschen Rohres samt dem Spülwasser quantitativ in eine Schale, erhitzt, bis das Volumen der Flüssigkeit auf 200—300 ccm reduziert ist und dampft dann unter Zusatz von geringen Mengen Alkohol auf dem Wasserbade zur Trockne ein. Der Rückstand wird in derselben Schale zerrieben und unter Umrühren wiederholt mit kleinen Mengen absoluten Alkohols extrahiert, der Alkohol verdunstet, der Rückstand wieder mit absolutem Alkohol aufgenommen und nach dem Verdunsten des Alkohols zum drittenmal mit 99,8 prozentigem Alkohol behandelt, wodurch das Chlorammonium bis auf Spuren entfernt wird. Der letzte Trockenrückstand wird in wenig Wasser gelöst und die gelbliche Lösung quantitativ in den Kolben übergeführt den man sofort mit dem Kühler verbindet. In das Péligotsche Rohr bringt man 15—20 ccm verdünnte Salzsäure, läßt aus dem Hahntrichter 25 ccm Hypobromitlösung (25 ccm Brom in 500 ccm einer 20 prozentigen Kalilauge) in den Kolben tropfenweise zufließen und schüttelt das Gemisch von Hypobromit und Chloriden vorsichtig durch, wobei die Flüssigkeit nach schwachem Aufschäumen eine zitronengelbe Farbe annimmt, wenn nicht, muß man noch Hypobromitlösung zusetzen.

Um den Überschuß von Hypobromit zu beseitigen, läßt man durch den Trichter eine dem Hypobromit gleiche Menge auf $\frac{1}{3}$ verdünnter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 in den Kolben zufließen, wobei die Flüssigkeit durch das freigewordene Jod eine kirschrote Färbung annimmt. Nun wird zunächst das Brom destilliert, wobei die Flüssigkeit im Destillationskolben ihre ursprüngliche gelbliche Färbung wieder aufnimmt und sich auf die Hälfte reduziert hat. Man unterbricht dann die Destillation, ersetzt die Vorlage durch eine andere, ebenfalls mit 10—15 ccm Salzsäure beschickte und dampft das bromhaltige Destillat sofort auf dem Wasserbade ein.

Um das Trimethylamin zu destillieren, macht man den Inhalt des Destillationskolbens mit einem dem vorher angewendeten Salzsäurevolumen gleichen Volumen einer 30 prozentigen Kalilauge alkalisch, wobei sich die Flüssigkeit entfärbt. Nun wirft man in den Destillationskolben einige an einem Ende zugeschmolzene Kapillaren und beginnt die Destillation, die ohne Störungen vor sich geht. Durch Zufließenlassen von Wasser aus dem Trichter erhält man die Flüssigkeit im Destillationskolben auf annähernd gleichem Niveau, bis etwa 300 ccm Destillat in die Vorlage übergegangen sind. Nachdem man sich durch Prüfung mit Lackmuspapier überführt hat, daß das Destillat nicht mehr basisch reagiert, unterbricht man die Destillation und führt das Destillat und den Inhalt des Péligotschen Rohres samt Waschwasser

quantitativ in dieselbe Porzellanschale, die das erste Destillat enthält, und dampft auf dem Wasserbade bis auf wenige Kubikzentimeter ein.

Während des Eindampfens füllt man in das Péligotsche Rohr und in die Vorlage zusammen 25 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure und schließt beide wieder in den Apparat ein. Der Rückstand des eingedampften Destillates wird in den Destillationskolben gebracht, durch Zufließenlassen aus dem Trichter von 50 ccm einer 10 prozentigen Kalilauge alkalisch gemacht und dann das Trimethylamin überdestilliert. Der Inhalt der Vorlage und des Péligottsschen Rohres wird mit einer $\frac{1}{10}$ -Normalkalilauge titriert.

Tetramethyldiamin (Putreszin) $C_4H_{12}N_2$



Eigenschaften. Das Tetramethyldiamin ist eine farblose Kristallmasse, die bei 23—24° C schmilzt und bei 158—160° C siedet. Es riecht stark nach Piperidin, reagiert alkalisch und zieht Kohlensäure an. Es löst sich leicht in Wasser und verbindet sich mit Säuren unter Bildung von in Wasser leicht löslichen Salzen.

Pentamethyldiamin (Kadaverin) $C_5H_{14}N_2$

Eigenschaften. Das Pentamethyldiamin bildet einen Sirup, der bei niedriger Temperatur zu einem Kristallbrei erstarrt. Es löst sich in Wasser, Alkohol, schwerer in Äther, riecht nach Piperidin, nimmt begierig Kohlensäure an der Luft unter Bildung von Karbonaten auf.

Nachweis des Tetramethylen- und Pentamethyldiamins im Harn.

Verfahren von Baumann und Udransky. Man versetzt 1500 ccm Harn mit 200 ccm einer 10 prozentigen Natronlauge und 20—25 ccm Benzoylchlorid und schüttelt, bis der Geruch nach Benzoylchlorid verschwunden ist, wobei sich die Benzoessäureester der Diamine als gelbliche, undeutlich kristallinische Niederschläge neben Phosphaten und den Benzoylverbindungen der normalen Kohlehydrate abscheiden. Der Niederschlag wird nach mehrtägigem Stehen abfiltriert, mit Wasser gewaschen, bis das ablaufende Filtrat klar wird, in Alkohol gelöst und die Lösung nach dem Eindampfen auf ein kleines Volumen in das 30 fache Volumen Wasser gegossen, wobei sich allmählich eine Kristallisation ausscheidet, die nach mehrtägigem Stehen abfiltriert wird und mit Wasser gewaschen, bis dieses klar abläuft. Die milchige Trübung, die in der Mutterlauge und dem ersten Waschwasser auftritt, ist durch die Benzoylverbindungen der Kohlehydrate verursacht. Die Kristalle werden in möglichst wenig Alkohol gelöst und von neuem mit Wasser gefällt. Ob die so erhaltenen Kristalle nur aus Dibenzoylputreszin oder Dibenzoylkadaverin bestehen oder ob ein Gemenge der beiden Verbindungen vorliegt, wird durch die Schmelzpunktbestimmung festgestellt, wobei die Benzoylverbindung des Putreszins bei 176° C, die des Kadaverins bei 130° C, während die Mischung bei einer Zwischentemperatur schmilzt. Liegt eine Mischung vor, so löst man die Kristalle in warmem Alkohol und gießt diese Lösung in das 20 fache Volumen Äther ein, aus dem sich beim Erkalten

die Kristalle des fast reinen Dibenzoyltetramethylendiamins ausscheiden, während das Dibenzoylpentamethylendiamin in Lösung bleibt und nach dem Verdunsten des Äthers in Kristallen erhalten wird. Um die im Filtrat gebliebenen Reste noch aus dem Harne zu erhalten, säuert man mit Schwefelsäure stark an und schüttelt mehrfach mit dem gleichen Volumen Äther aus, wodurch die Benzoldiamine der wässerigen Lösung entzogen werden. Der Äther wird verdunstet, der Rückstand mit Natronlauge alkalisch gemacht und der Kristallisation in der Kälte überlassen. Nach 24 Stunden werden die Kristalle abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen, dann in wenig Alkohol gelöst und durch Zusatz von viel Wasser abgeschieden. Die so erhaltenen Kristalle vereinigt man mit der Hauptmenge.

Verfahren von Loewy und Neuberg ¹⁾. Man befreit den Harn vom ausgeschiedenen Zystin durch Filtrieren, säuert ihn mit Schwefelsäure schwach an und fällt mit Phosphorwolframsäure. Der abfiltrierte und mit Wasser ausgewaschene Niederschlag wird durch Kochen mit Barytwasser zerlegt und das Filtrat vom Baryt durch Kohlensäure befreit. Die Basenlösung wird auf dem Wasserbade eingedampft, mit Natriumhydroxyd und dann mit Phenylisozyanat tropfenweise versetzt und lebhaft geschüttelt, wodurch die Phenylisozyanatverbindungen der beiden Diamine ausfallen, und jeder Tropfen des einfallenden Isozyanats hat unter deutlicher Erwärmung die sofortige Abscheidung eines voluminösen Niederschlages zur Folge. Sobald sich dessen Menge auf erneuten Zyanzusatz nicht mehr vermehrt, wird er abfiltriert und mit Wasser gut gewaschen. Durch Waschen mit absolutem Alkohol, in dem er absolut unlöslich ist, wird er von möglicherweise ausgeschiedenem Diphenylharnstoff befreit, dann in warmem Pyridin gelöst und durch vorsichtigen Zusatz von Wasser wieder ausgefällt und so in schneeweißen Kristallen erhalten.

Aus dem Schmelzpunkt der so gewonnenen Kristalle ist ersichtlich, ob Diphenylisozyanattetraphenylendiamin vom Schmelzpunkte 240 ° C oder Diphenylisozyanatpentamethylendiamin vom Schmelzpunkte 207 bis 209 ° C oder ein Gemisch beider Verbindungen vorliegt. Liegen Gemische vor, so ist eine derselben durch Phenylharnstoffderivate ebenfalls möglich. Fügt man zu einer nach dem Abkühlen gerade gesättigten Lösung der trockenen Phenylcyanatverbindungen in Pyridin wasserfreies Azeton, so fällt momentan das Tetramethylderivat, während die Pentamethylenverbindung sich erst nach mehrstündigem Stehen ausscheidet. Beide Fraktionen können durch Umkristallisieren gereinigt werden.

27. Blut und Blutfarbstoff.

Ein bluthaltiger Harn zeichnet sich durch seine eigentümliche rötliche bis braune Färbung aus, die stets mit Trübung verbunden ist.

¹⁾ A. Loewy und C. Neuberg, Über Zystinurie. Zur Kenntnis der Diamine. Zeitschr. f. physiol. Chemie **43**, 338 (1904/05).

Zur Erkennung des Blutes im Harn bedient man sich der mikroskopischen, spektroskopischen und chemischen Untersuchung.

Ein Blut oder Blutfarbstoff enthaltender Harn zeigt bei der spektroskopischen Untersuchung die Streifen des Oxyhämoglobins bzw. Methämoglobins, das sich leicht und schnell in Hämoglobin und Oxyhämoglobin überführen läßt. Die spektroskopische Prüfung ist besonders wichtig, wenn es sich darum handelt, nicht nur Blutfarbstoff überhaupt nachzuweisen, sondern auch die Art des vorhandenen Farbstoffes festzustellen.

Die Guajakprobe. 5 ccm Harn werden in einem Reagenzglas mit einer Mischung von gleichen Teilen 3 prozentiger Guajaktinktur und altem Terpentinöl, das an der Luft unter dem Einflusse des Lichtes stark ozonhaltig geworden ist, versetzt, wobei diese Mischung nicht die geringste Blaufärbung zeigen darf. Bei Gegenwart von Blut oder Blutfarbstoff tritt an der Berührungsstelle der Flüssigkeiten erst ein blaugrüner Ring, der allmählich schön blau wird; beim Umschütteln wird die Flüssigkeit mehr oder weniger schön blau. Eiterhaltiger Harn kann, auch wenn kein Blut vorhanden ist, mit diesem Reagens eine blaue Farbe geben; in diesem Falle erhält man aber die Färbung ohne Zusatz von Terpentinöl. Versetzt man gekochten eiterhaltigen Harn mit diesem Reagens, so entsteht überhaupt keine Färbung. Verfügt man nicht über ozonhaltiges Terpentinöl, so kann man dieses durch frisches Wasserstoffsuperoxyd ersetzen. Einen in Zersetzung begriffenen alkalischen Harn muß man vor Anstellung der Reaktion schwach ansäuern. Das Terpentinöl wird im Tageslichte, die Guajaktinktur in einer Flasche von braunem oder blauem Glas aufbewahrt. Die Brauchbarkeit der Reagenzien muß mit einer bluthaltigen Flüssigkeit geprüft werden.

Hellersche Probe. Erhitzt man einen bluthaltigen, neutralen oder schwach sauren Harn zum Sieden, so erhält man stets einen aus Eiweiß und Hämatin bestehenden, mißfarbigen Niederschlag. Setzt man der siedend heißen Probe Natronlauge hinzu, so klärt sich die Flüssigkeit, wird in dünner Schicht grün (Hämatinalkali) und setzt einen roten, bei auffallendem Licht in Grün spielenden Niederschlag ab, der aus Erdphosphaten und Hämatin besteht. Mit diesem Niederschlag kann man die Häminprobe machen. Enthält der Niederschlag neben größeren Mengen Erdphosphat nur wenig Blutfarbstoff, so wäscht man ihn zur Entfernung der Erdphosphate mit verdünnter Essigsäure und stellt aus dem ungelösten Rückstande die Teichmannschen Häminkristalle dar. Ist dagegen die Menge der Phosphate sehr gering, so versetzt man den Harn mit wenig Kalziumchloridlösung, erhitzt zum Sieden und fügt Natronlauge und etwas Natriumphosphatlösung hinzu. Bei sehr geringen Blutmengen macht man den Harn erst durch Zusatz von Ammoniak sehr schwach alkalisch, fügt Gerbsäure hinzu, säuert mit Essigsäure an und stellt aus dem so erhaltenen Niederschlag Häminkristalle dar.

Sehr kleine Mengen von Blut bzw. Blutfarbstoff lassen sich auch

in folgender Weise nachweisen. Man versetzt etwa 100 ccm Harn mit etwas Eiweißlösung oder eiweißhaltigem Harn, erhitzt zum Kochen, wobei ein Koagulum sich bildet. Dieses wird abfiltriert, ausgewaschen, abgepreßt, mit schwefelsäurehaltigem Alkohol zerrieben, die Mischung dann erwärmt und filtriert. Das Filtrat gibt nach Zusatz von Natronlauge und Schwefelammonium die Streifen des Hämochromogens.

Hämatoporphyrin.

Nachweis. Der Harn wird nach Salkowski¹⁾ mit alkalischer Chlorbariumlösung (einer Mischung von gleichen Volumina kaltgesättigter Barythydratlösung und 10 prozentiger Chlorbariumlösung) oder nach Hammarsten²⁾ mit Bariumazetatlösung gefällt. Den Niederschlag wäscht man mit Wasser, dann einmal mit Alkohol aus, digeriert ihn bei Zimmertemperatur mit salzsäure- oder schwefelsäurehaltigem Alkohol, filtriert und wäscht den Niederschlag mit wenig absolutem Alkohol nach. Das Filtrat ist rot gefärbt und zeigt das charakteristische Spektrum des Hämatoporphyrins in saurer Lösung — einen Streifen vor D und einen zweiten Streifen zwischen D und E — und gibt beim Übersättigen mit Ammoniak das Spektrum des alkalischen Hämatoporphyrins — vom roten bis zum violetten Ende des Spektrums vier Streifen. Mischt man den alkoholischen Auszug mit Chloroform, fügt eine große Menge Wasser hinzu und schüttelt vorsichtig, so erhält man eine Chloroformschicht, die sehr reines Hämatoporphyrin enthält, während in der darüber stehenden alkoholisch-wässrigen Flüssigkeit sich die anderen Farbstoffe neben etwas Hämatoporphyrin befinden.

Nach Garrod³⁾ versetzt man den Harn mit 10 prozentiger Natronlauge (20 ccm auf 100 ccm Harn), wäscht den dabei ausfallenden, den Farbstoff enthaltenden Phosphatniederschlag mit Wasser nach, löst ihn in 20 ccm salzsäurehaltigem Alkohol und untersucht die Lösung spektroskopisch. Zur genaueren Untersuchung versetzt man die Lösung mit Ammoniak, bis sich wieder ein Phosphatniederschlag ausscheidet, säuert bis zur Lösung des Niederschlages mit Essigsäure an, schüttelt dann mit Chloroform aus und untersucht spektroskopisch. Die Chloroformlösung zeigt das Spektrum des alkalischen Hämatoporphyrins.

28. Gallensäuren.

Nachweis. Zum Nachweis der Gallensäuren im Harne müssen diese zuerst nach der von Hoppe-Seyler angegebenen Methode isoliert und mittels der Pettenkofer'schen Reaktion, oder auf Glykocholsäure, Taurocholsäure und Cholsäure, oder spektroskopisch geprüft werden.

¹⁾ E. Salkowski, Über Vorkommen und Nachweis des Hämatoporphyrins im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie **15**, 286 (1891).

²⁾ O. Hammarsten, Skandin. Archiv f. Physiol. **3**, 322 (1892).

³⁾ A. Garrod, On the occurrence and detection of haematoporphyrin in the urine. Journ. of Physiol. **13**, 603 (1892).

Eiweißhaltiger Harn wird zunächst mit Essigsäure versetzt, gekocht, bis alles Eiweiß ausgeschieden ist, filtriert, stark eingengt und der Rückstand mit starkem Alkohol extrahiert. Das Filtrat wird durch Verdunsten vom Alkohol befreit, der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen und darauf mit Bleiessig und wenig Ammoniak gefällt. Der abfiltrierte und mit wenig Wasser ausgewaschene Niederschlag wird mit Alkohol gekocht und die heiß filtrierte Lösung, die die Bleisalze der Gallensäuren enthält, mit einigen Tropfen Sodalösung versetzt und im Wasserbade zur Trockne verdunstet. Der Rückstand wird mit absolutem Alkohol ausgekocht, die Lösung auf ein kleines Volumen eingengt, mit einem Überschuß von Äther versetzt und in einem verschlossenen Gefäß zur Kristallisation stehen gelassen. Will man die Gallensäuren nur nachweisen, so löst man den harzigen Niederschlag, ohne die Kristallisation abzuwarten, in Wasser und stellt die Pettenkofersche Reaktion an. Handelt es sich aber darum, ob Glykocholsäure, Taurocholsäure oder Cholsäure vorliegt, so läßt man die durch Äther gefällten Natronsalze zunächst kristallisieren, gießt den Äther ab, löst die Kristalle in wenig Wasser und benutzt das verschiedene Verhalten der Gallensäuren gegen Bleizucker zur Trennung. Durch Bleizucker werden Glykocholsäure und Cholsäure gefällt, während nur sehr geringe Mengen von Taurocholsäure mitgerissen werden, wenn die Flüssigkeit nicht stark alkalisch ist. Nach der Ausfällung dieser Säuren kann die Taurocholsäure durch Bleiessig und Ammoniak gefällt werden.

Die Glykocholsäure unterscheidet sich von der Cholsäure durch das Drehungsvermögen und durch das Ausbleiben der Myliusschen Jodreaktion, von der Taurocholsäure durch die Schwerlöslichkeit in Wasser und den fehlenden Schwefelgehalt.

Zum direkten Nachweis der Gallensäuren im Harn verfährt man nach Straßburg in der Weise, daß man einen Streifen Filtrierpapier in den Harn taucht, in dem man zuvor ein Stück Zucker aufgelöst hat, und dann auf das getrocknete Papier einen Tropfen konzentrierte Schwefelsäure gibt; nach $\frac{1}{4}$ Minute entsteht eine schön violette Färbung, die die Gegenwart von Gallensäuren zeigt.

Udranski verdünnt 1 Tropfen Harn mit 1 ccm Wasser, versetzt dann mit einem Tropfen Furfurolwasser und 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure — es entsteht eine kirschrote Färbung in Gegenwart von Gallensäuren.

29. Gallenfarbstoffe.

Zum Nachweis der Gallenfarbstoffe im Harne dienen folgende Reaktionen.

Gmelins Probe in der Modifikation von Rosenbach besteht darin, daß man den Harn durch ein kleines Filter filtriert, nach dem Abtropfen der Flüssigkeit die Innenseite des auf trockenem Filterpapier ausgebreiteten Filters mit einem Tropfen Salpetersäure, die wenig salpetrige Säure enthält, betupft, wobei ein blaßgelber Fleck

entsteht, der von konzentrischen farbigen Ringen umgeben ist, die von innen nach außen gelbrot, violett, blau und grün erscheinen.

Reaktion von Huppert, modifiziert von Salkowski ¹⁾. Man versetzt den Harn mit einigen Tropfen Natriumkarbonat bis zur alkalischen Reaktion und dann tropfenweise mit Chlorkalziumlösung, bis die über dem ausgeschiedenen Niederschlage stehende Flüssigkeit die Farbe eines normalen Harnes zeigt. Der die Gallenfarbstoffe enthaltende Niederschlag wird abfiltriert, gut ausgewaschen, in Alkohol, der in 100 ccm 5 ccm konzentrierte Salzsäure enthält, gelöst und zum Kochen erhitzt, wobei die Lösung grün oder blaugrün wird. Läßt man die grüne Lösung erkalten und fügt einige Tropfen Salpetersäure hinzu, so färbt sie sich blau, violett, rot.

Nach der Modifikation von Nakayama ²⁾ versetzt man 5 ccm Harn mit dem gleichen Volumen einer 10 prozentigen Bariumchloridlösung, zentrifugiert das Gemisch, gießt die Flüssigkeit ab und erhitzt den Niederschlag mit 2 ccm des Reagens (1 ccm einer 4 g Eisenchlorid im Liter enthaltenden Salzsäure und 99 ccm 95 volumprozentiger Alkohol) bis zum Kochen, wobei die Flüssigkeit sich grün oder blaugrün färbt. Wird die grüne Farbstofflösung mit (gelbgefärbter) Salpetersäure versetzt, so geht die Farbe in Violett und Rot über.

Bouma ³⁾ verfährt in der Weise, daß er 8 ccm sauren Harn mit 2 ccm einer 10 prozentigen Kalziumchloridlösung, dann mit schwacher Ammoniaklösung bis zur fast neutralen Reaktion versetzt und zentrifugiert, mischt das Sediment mit destilliertem Wasser und zentrifugiert nochmals. Die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit wird abgegossen, dieser in einer Mischung von 1 ccm des Obermayerschen Reagens (2 g Eisenchlorid in 1 Liter Salzsäure) und 4 ccm absoluten Alkohols gelöst. Bei Anwesenheit von Gallenfarbstoff färbt sich die Lösung grün.

Reaktion von Hammarsten ⁴⁾. Man benutzt hierzu ein Gemisch aus 1 Teil 25 prozentiger Salpetersäure und 19 Teilen 25 prozentiger Salzsäure, das durch Stehen gelblich werden muß. Von diesem Säuregemisch mischt man 1 Volumen mit 4 Volumen Alkohol.

Für gewöhnliche Fälle genügt es, etwa 2—3 ccm des Reagens mit einigen Tropfen des zu prüfenden Harnes durchzuschütteln, um in Gegenwart von Gallenfarbstoff eine schön grüne oder blaugrüne, tagelang bleibende Färbung zu erhalten. Bei Gegenwart von sehr geringen Mengen Gallenfarbstoff, sowie bei gleichzeitiger Gegenwart von Blutfarbstoff oder anderen Farbstoffen bringt man 10 ccm des sauer oder fast neutral, aber nicht alkalisch reagierenden Harnes in

¹⁾ E. Salkowski, Praktikum. J. Munk, Über den Nachweis von Gallenfarbstoff im Harn. Arch. f. Anatom. u. Physiol. 1898, 361.

²⁾ Nakayama, Über eine Modifikation der Huppertschen Gallenfarbstoffreaktion. Zeitschr. f. physiol. Chemie 36, 398 (1902).

³⁾ J. Bouma, Zur Frühdiagnose des Ikterus. Deutschemediz. Wochenschr. 28, 866 (1902); Eine klinische Methode zur quantitativen Bestimmung der Gallenfarbstoffe 30, 881 (1904).

⁴⁾ O. Hammarsten, Ein Verfahren zum Nachweis der Gallenfarbstoffe, insbesondere im Harn. Skandin. Archiv f. Physiol. 9, 313 (1899).

ein Rohr einer Zentrifuge, versetzt mit Bariumchlorid, zentrifugiert eine Minute lang, gießt die über dem Bodensatz stehende Flüssigkeit ab, fügt 1 ccm des Reagenses hinzu und zentrifugiert nochmals. Man erhält eine schön grüne Lösung, die durch weiteren allmählichen Zusatz des Säuregemenges durch Blau in Violett, Rot und Rotgelb übergeführt werden kann. Die Empfindlichkeit der Reaktion ist 1 Teil Gallenfarbstoff in 500 000—1 000 000 Teilen Harn.

Die Ehrlichsche Probe besteht darin, daß man den Harn mit dem gleichen Volumen verdünnter Essigsäure und mit einer Lösung von Sulfodiazobenzol tropfenweise versetzt (die Sulfodiazobenzollösung besteht aus 1 g Sulfanilsäure, 15 ccm Chlorwasserstoffsäure und 0,1 g Natriumnitrit in Wasser zum Liter gelöst), wodurch die Flüssigkeit in Gegenwart von Bilirubin dunkelrot gefärbt wird; auf Zusatz von Eisessig geht die Farbe in Blauviolett über.

30. Kohlehydrate.

a) Traubenzucker.

Der zur Prüfung auf Zucker angewandte Harn muß eiweißfrei sein oder durch Koagulation enteiweißt werden.

Von den gebräuchlichsten Methoden zum Nachweis und zu quantitativen Bestimmungen des Zuckers im Harn mögen hier folgende Erwähnung finden.

α) Qualitativer Nachweis.

Die Trommersche Probe. Man versetzt den zu prüfenden Harn mit dem gleichen Volumen Natronlauge und fügt vorsichtig etwas 10prozentige Kupfersulfatlösung hinzu, wobei sich zuerst das Kupferoxydhydrat zu einer schön azurblau gefärbten Flüssigkeit löst und fährt mit dem weiteren Zusatz von Kupfersulfatlösung fort, bis eine sehr kleine Menge Hydrat ungelöst bleibt. Erhitzt man nun allmählich zum Sieden, so beginnt schon unterhalb der Siedehitze sich gelbes Oxydulhydrat oder rotes Oxydul auszuscheiden.

Empfindlicher ist diese Probe bei Anwendung der Fehlingschen Lösung.

Man füllt je $\frac{1}{2}$ ccm der beiden Fehlingschen Lösungen in ein Reagenzglas, verdünnt mit etwa 3 ccm Wasser, fügt 1 ccm Harn hinzu und stellt die Mischung in ein siedendes Wasserbad. Nach 5 Minuten langem Erwärmen scheidet sich bei Anwesenheit von Zucker gelbrotes Kupferoxydul aus.

Böttger-Nylander-Alménische Probe. Das Böttger-Nylander-sche Reagens besteht aus einer Auflösung von 2 g basischem Wismutnitrat, 4 g Seignettesalz (weinsaures Kalium-Natrium) in 100 ccm 8prozentiger Natronlauge. Davon nimmt man 1 ccm, verdünnt mit 3 ccm Wasser und setzt 1 ccm Harn hinzu. Dann erhitzt man im Wasserbade eine halbe Stunde lang. Bei Anwesenheit von Zucker tritt Schwarzfärbung (Abscheidung von metallischem Wismut) ein, und nach einiger Zeit setzt sich ein schwarzer Bodensatz ab. In Gegenwart von sehr wenig Zucker wird der Harn nicht schwarz, sondern nur dunkler gefärbt, und erst nach längerem Stehen beobachtet man am oberen Rande des Phosphatniederschlags einen dunklen oder schwarzen, feinen Saum (Wismut). Bei solchen Harnen setzt man von der Reagenzlösung nur 1 ccm auf je 10 ccm Harn; bei höherem Zuckergehalt setzt man eine größere Menge des Reagens hinzu.

Phenylhydrazinprobe (Fischer). Man versetzt 5 ccm Harn in einem Reagenzrohre mit 5 Tropfen reinem Phenylhydrazin und 10 Tropfen Eisessig, mischt gut durch und stellt das Reagenzglas eine Stunde lang in ein kochendes Wasserbad. Nach dem Erkalten scheidet sich bei Gegenwart von nicht zu wenig Zucker ein gelber kristallinischer Niederschlag von Phenylglukosazon ab. Er-

scheint der Niederschlag amorph, so findet man unter dem Mikroskop schöne, charakteristische, zu Büscheln und Garben vereinigte Kristallnadeln von zeisig-gelber Farbe. In zweifelhaften Fällen ist es jedoch notwendig, die Natur des Niederschlages näher zu untersuchen. Zu diesem Zweck löst man den Niederschlag nach Neuberg in Pyridin und fällt mit Benzol oder Ligroin, oder Äther; schmelzen die so erhaltenen gelben Kristalle bei 204—205° C, so ist Glukose anwesend. Man darf nicht übersehen, daß Fruchtzucker dasselbe Osazon wie Traubenzucker liefert.

Einfacher und bequemer gestaltet sich die Modifikation dieser Probe von Neumann. Man versetzt 5 ccm Harn mit 2 ccm einer mit essigsäurem Natrium gesättigten 30 prozentigen Essigsäure, fügt 2 Tropfen reines Phenylhydrazin hinzu und kocht auf 3 ccm ein. Nach dem Erkalten erhält man schöne Kristalle von Phenylglukosazon, selbst bei 0,02 Promille Zuckergehalt. Neumann verwendet ein besonderes, zu diesem Zwecke graduiertes Reagenzglas.

Methode von Rubner-Penzoldt. Man versetzt den zu prüfenden Harn mit einigen Tropfen Bleiessig, wobei ein Niederschlag entsteht, filtriert und fügt tropfenweise so viel Ammoniak hinzu, daß sich ein flockiger Niederschlag ausscheidet, der sich beim Erwärmen fast zum Sieden bei Gegenwart von Zucker rosarot färbt.

Gärungsprobe. In einem Gärungsröhrchen wird der filtrierte Harn mit einem Körnchen Hefe versetzt und im Brutschrank bei 37—40° C 24 Stunden stehen gelassen. Bei Anwesenheit von Traubenzucker bildet sich oben im Röhrchen eine Schicht von Kohlendioxyd. Zugleich müssen zwei Kontrollversuche angestellt werden. Erstens muß man den Harn ohne Hefe aufstellen, um sich zu überführen, ob nicht der Harn selbst gärende resp. Kohlendioxyd bildende Mikroorganismen enthält; zweitens mit der Hefe eine 1 prozentige Traubenzuckerlösung aufstellen, um die Wirksamkeit der Hefe zu prüfen.

Zur Isolierung kleiner Mengen Zucker aus dem Harne fällt man den Harn mit Bleizucker, filtriert vom abgeschiedenen Niederschlag ab, fällt das Filtrat mit ammoniakalischem Bleiessig, wäscht den entstandenen Niederschlag mit Wasser, suspendiert ihn in Wasser und versetzt mit Schwefelwasserstoff, engt das Filtrat vom Bleisulfid ein, versetzt es mit starkem Alkohol und dann mit einer alkoholischen Lösung von Ätzkali. Den aus Zuckerkali bestehenden Niederschlag löst man in Wasser, fällt das Kali mit überschüssiger Weinsäure, neutralisiert das Filtrat mit kohlen-säurem Kalk und filtriert. Das Filtrat wird nach einer der oben angegebenen Methoden auf Zucker geprüft.

Die Isolierung des Zuckers und der Kohlehydrate des Harnes überhaupt geschieht nach Baumann¹⁾ in der Weise, daß man den Harn mit Natronlauge alkalisch macht, um die Erdphosphate auszufällen, das Filtrat mit 10 ccm Benzoylchlorid und 120 ccm 10 prozentiger Natronlauge auf je 100 ccm versetzt und schüttelt, bis der Geruch nach Benzoylchlorid verschwunden ist. Nach längerem Stehen sammelt man die Ester, zerreibt sie fein, verseift sie mit einer alkoholischen Natriumäthylatlösung und trennt die verschiedenen Kohlehydrate nach Baisch²⁾ in folgender Weise.

Man löst 7,5 g metallisches Natrium in 300 ccm absolutem Alkohol, kühlt auf — 5° C ab und trägt unter starkem Schütteln allmählich 10 g aufs feinste gepulverte Benzoyl-ester ein, wobei man diese Temperatur während der ganzen Zeit erhält. Die Verseifung dauert 20 bis 40 Minuten; das Ende der Reaktion erkennt man daran, daß eine Probe, mit dem 3—4fachen Volumen Wasser versetzt, keine Trübung vom

¹⁾ E. Baumann, Chem. Berichte **19**, 3218 (1886).

²⁾ K. Baisch, Zeitschr. f. physiol. Chemie **19**, 339 (1894).

unveränderten Benzoat mehr gibt. Hierauf setzt man so viel Schwefelsäure in 300 ccm Wasser hinzu, daß alles Natrium als primäres Sulfat NaHSO_4 gebunden ist, und schüttelt die so in Freiheit gesetzte Benzoesäure mit je 600 ccm Äther aus, wobei man durch Zusatz von kleinen Mengen Wasser oder Alkohol die Bildung von Emulsionen verhindert. Die Ätherauszüge werden, um den in den alkoholisch-ätherischen Auszügen enthaltenen Zucker nicht zu verlieren, jeder mit 100 ccm Wasser ausgeschüttelt. Die vereinigten wässerigen und alkoholisch-wässerigen Auszüge werden mit Natriumhydroxyd nahezu und fester Soda vollends neutralisiert, mit dem dreifachen Volumen absoluten Alkohols versetzt, um das Natriumsulfat zu entfernen, und über Nacht stehen gelassen. Nach dem Absaugen und Abdampfen des Alkohols erhält man eine wässrige Lösung der Kohlehydrate. Durch Fällung mit Alkohol, Phenylhydrazin oder Bleisalzen sind so Glukose, Isomaltose, Harn-dextrin und an den Farbenreaktionen auch Pentosen mit größerer oder geringerer Sicherheit aus den Benzoylestern erkannt.

β) Quantitative Bestimmung.

Der zu untersuchende Harn muß absolut eiweißfrei sein; sollte aber Eiweiß zugegen sein, so muß es durch Koagulation unter Zusatz von Kochsalz und Essigsäure entfernt werden, wobei man dafür Sorge tragen muß, daß das ursprüngliche Volumen des Harnes wiederhergestellt wird.

Zur Bestimmung des Zuckergehaltes im Harn bedient man sich gewöhnlich der Titration mit Fehlingscher oder Knappscher Lösung, der Gärung, Polarisation usw.

Quantitative Bestimmung des Zuckers durch Reduktion von Metallsalzen.

a) Maßanalytische Methoden.

1. Titration mit Fehlingscher Lösung.

Vor der Titrierung verdünnt man gewöhnlich den eiweißfreien Harn so, daß zur Reduktion von 10 ccm Kupferlösung zwischen 5 und 10 ccm des verdünnten Harnes verbraucht werden, was einem Zuckergehalt von $\frac{1}{2}$ —1 Proz. entspricht. Einen Harn vom spezifischen Gewicht 1,030 verdünnt man gewöhnlich auf das Fünffache, konzentriertere auf das Zehnfache. Man läßt aus einer Bürette 20 ccm des filtrierten Harnes in einen 200 ccm fassenden Meßkolben fließen und füllt mit destilliertem Wasser bis zur Marke auf.

Die Fehlingsche Lösung besteht aus zwei getrennt zu haltenden Teilen:

1. Man löst 34,65 g wiederholt aus heißem Wasser umkristallisiertes Kupfersulfat in destilliertem Wasser und füllt zum Liter auf.

2. Die Seignettesalzlösung erhält man durch Auflösung von 173 g des Salzes in etwa 300—350 ccm Wasser unter Zusatz von 600 ccm

Wasser, Natronlauge vom spezifischen Gewicht 1,12 und Verdünnung mit Wasser zum Liter.

Von diesen beiden Lösungen bringt man mit der Pipette genau je 10 ccm in eine Porzellanschale und verdünnt mit der vierfachen Menge Wasser. Dann erhitzt man zum Sieden und läßt nun aus der direkt über dem Dreifuß befestigten Bürette so lange zunächst je 5 ccm Harn zufließen, bis die über dem entstehenden gelbroten Kupferoxydulniederschlag befindliche Flüssigkeit nicht mehr blau erscheint. Man muß indessen nach jeder Probe eine kurze Zeit warten, bis sich der Niederschlag abgesetzt hat, sonst kann man die Farbe nicht erkennen. Ist die Flüssigkeit farblos, so nimmt man mit einem Glasstab einen Tropfen auf einen Tiegeldeckel, setzt einen Tropfen Essigsäure und einen Tropfen 5 prozentige Ferrozyankaliumlösung hinzu — ist in der Lösung noch unreduziertes Kupfer vorhanden, so entsteht braunes Ferrozyankupfer. Hat man auf diese Weise die Grenzen des Zuckergehaltes auf 5 ccm bestimmt, so titriert man nun innerhalb dieser 5 ccm genau bis 0,1 ccm.

Man berechnet dann den Zuckergehalt aus dem bekannten Kupfergehalt der Fehlingschen Lösung. Je 20 ccm Fehlingscher Lösung entsprechen 0,1 g Traubenzucker. Hat man also z. B. 38,2 ccm Harn dazu verbraucht, die 20 ccm zu reduzieren, so enthalten diese 38,2 ccm 0,1 g Traubenzucker, also 100 ccm $\frac{100 \times 0,1}{38,2}$ g Traubenzucker. Der ursprüngliche, zehnmal verdünnte Harn enthält somit zehnmal soviel.

2. Titration mit Knappscher Lösung.

Das dieser Methode zugrundeliegende Prinzip ist, daß eine alkalische Lösung von Quecksilberzyanid durch Traubenzucker zu metallischem Quecksilber reduziert wird. Die Titerflüssigkeit enthält im Liter 10 g chemisch reines Quecksilberzyanid und 100 ccm Natronlauge vom spezifischen Gewichte 1,145. 20 ccm dieser Lösung entsprechen 0,050 g Traubenzucker.

Der zu titrierende Harn darf nicht mehr als 1 Proz. Zucker enthalten, es empfiehlt sich also, durch einen Vorversuch den nötigen Verdünnungsgrad festzustellen.

Man bringt in einen Kolben 40 ccm der Knappschen Lösung, verdünnt mit dem 3-4fachen Volumen Wasser, erhitzt zum Sieden und läßt aus der Bürette den verdünnten Harn allmählich und dann tropfenweise zufließen. Nach jedem Zusatz läßt man $\frac{1}{2}$ Minute kochen. Vor der Endreaktion beginnt die Flüssigkeit sich zu klären, und es scheidet sich das Quecksilber mit den Phosphaten ab. Die Endreaktion führt man in der Weise aus, daß man mit einer Kapillare einen Tropfen der Flüssigkeit auf Filtrierpapier bringt, den feuchten Fleck über rauchender Salzsäure und dann über starkem Schwefelwasserstoff hält, wodurch sich der Fleck bei der Gegenwart von geringsten Mengen Quecksilber gelb färbt. Noch deutlicher tritt die Reaktion ein, wenn man einen Teil der filtrierten Flüssigkeit mit Essigsäure ansäuert und mit Schwefelwasserstoff versetzt.

3. Methode nach Pavy-Kumagawa-Suto-Kinoshita.

Bestimmung des Zuckers durch Reduktion mit ammoniakalischer Kupfersulfatlösung.

Erforderliche Reagenzien:

a) eine Kupferlösung, die 4,278 g Kupfersulfat ($\text{CuSO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O}$) in 1000 ccm enthält;

b) eine ammoniakalisch-alkalische Weinsäurelösung, die in 1000 ccm 21 Kaliumnatriumtartrat, 21 g festes Ätzkali und 300 ccm konzentrierte Ammoniaklösung ($D = 0,880$) enthält.

Man bringt in einen mit doppelt durchbohrtem Stopfen versehenen Kolben je 20 ccm von den beiden Lösungen. Die eine Öffnung trägt die Bürette mit der Zuckerlösung, die andere ein gebogenes Glasrohr, dessen Ende in einen mit verdünnter Schwefelsäure beschickten Erlenmeyerkolben taucht. Um eine Reoxydation des Kupferoxyduls zu CuO zu vermeiden, erwärmt man gelinde den Reduktionskolben, bis die Luft ausgetrieben ist, was man an der vollständigen Absorption der Ammoniakdämpfe in der verdünnten Schwefelsäure erkennen kann. Hierauf läßt man die Zuckerlösung aus der Bürette langsam zufließen und erhält die Lösung im gelinden Kochen, bis die blaugrüne Farbe gerade farblos wird, die Endreaktion ist erreicht.

Durch die erste Titration stellt man den ungefähren Zuckergehalt fest und verdünnt dann die zu ermittelnde Zuckerlösung auf ca. 0,2 Proz., bei diesem Gehalt liefert die Methode die genauesten Werte. Die 40 ccm der gemischten Titerlösungen entsprechen genau 0,1 g Traubenzucker.

Ist die Endreaktion überschritten, so tritt sofort schwache Gelbfärbung ein. Ein Niederschlag von Kupferoxydul darf unter keinen Umständen ausfallen.

4. Titrationsmethode nach J. Bang.

Erforderliche Lösungen.

a) Kupferlösung. In eine Lösung von 100 g Kaliumkarbonat in ca. 1500 ccm destilliertem Wasser bringt man 500 g Kaliumkarbonat und 400 g Rhodankalium, die sich schnell lösen. Zu dieser Lösung fügt man 25 g gereinigtes Kupfersulfat ($\text{CuSO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O}$) in etwa 150 ccm heißem destillierten Wasser nach Abkühlung hinzu, wobei keine nennenswerte Kohlensäureentwicklung stattfinden darf, füllt auf 2000 ccm und filtriert nach 24 Stunden. Die Lösung ist 3 Monate haltbar.

b) Hydroxylaminlösung. Man löst 200 g Rhodankalium in etwa 1500 ccm destilliertem Wasser, fügt eine Lösung von 6,55 g Hydroxylaminsulfat in destilliertem Wasser hinzu, füllt auf 2000 ccm auf und bewahrt die Lösung in einem dunklen Raume.

Ausführung der Bestimmung.

10 ccm der zu untersuchenden Zuckerlösung werden in einem 200 ccm fassenden Glaskolben mit 50 ccm der Kupferlösung versetzt,

auf dem Drahtnetze zum Sieden erhitzt, im Sieden genau 3 Minuten erhalten, rasch bis auf Zimmertemperatur abgekühlt und mit der Hydroxylaminlösung auf farblos titriert. Aus der Zahl der verbrauchten Kubikzentimeter Hydroxylaminlösung wird der Zucker nach folgender von Bang zusammengestellten Tabelle berechnet.

Verbrauchte ccm Hydroxylamin- lösung sind äquivalent	mg Zucker	Verbrauchte ccm Hydroxylamin- lösung sind äquivalent	mg Zucker	Verbrauchte ccm Hydroxylamin- lösung sind äquivalent	mg Zucker
0,75	60,0	17,0	33,9	33,5	14,9
1,0	59,4	17,5	33,3	34,0	14,4
1,5	58,4	18,0	32,6	34,5	13,9
2,0	57,3	18,5	32,0	35,0	13,4
2,5	56,2	19,0	31,4	35,5	12,9
3,0	55,0	19,5	30,8	36,0	12,4
3,5	54,3	20,0	30,2	36,5	11,9
4,0	53,4	20,5	29,6	37,0	11,4
4,5	52,6	21,0	29,0	37,5	10,9
5,5	51,6	21,5	28,3	38,0	10,4
5,0	50,7	22,0	27,7	38,5	9,9
6,0	49,8	22,5	27,1	39,0	9,4
6,5	48,9	23,0	26,5	39,5	9,0
7,0	48,0	23,5	25,8	40,0	8,5
7,5	47,2	24,0	25,2	40,5	8,1
8,0	46,3	24,5	24,6	41,0	7,6
8,5	45,5	25,0	24,1	41,5	7,2
9,0	44,7	25,5	23,5	42,0	6,7
9,5	44,0	26,0	22,9	42,5	6,3
10,0	43,3	26,5	22,3	43,0	5,8
10,5	42,5	27,0	21,8	43,5	5,4
11,0	41,8	27,5	21,2	44,0	4,9
11,5	41,1	28,0	20,7	44,5	4,5
12,0	40,4	28,5	20,1	45,0	4,1
12,5	39,7	29,0	19,6	45,5	3,7
13,0	39,0	29,5	19,1	46,0	3,3
13,5	38,3	30,0	18,6	46,5	2,9
14,0	37,7	30,5	18,0	47,0	2,5
14,5	37,1	31,0	17,5	47,5	2,1
15,0	36,4	31,5	17,0	48,0	1,7
15,5	35,8	32,0	16,5	48,5	1,3
16,0	35,1	32,5	15,9	49,0	0,9
16,5	34,5	33,0	15,4	—	—

Da die angewendeten 50 ccm Kupferlösung 0,06 g Zucker entsprechen, dürfen die anzuwendenden 10 ccm Harn nicht mehr als diese Menge enthalten, d. h. der Harn muß etwa 0,5 Proz. sein. Bei stärkerem Zuckergehalte muß man den Harn entsprechend verdünnen.

Für jedes $\frac{1}{10}$ ccm Hydroxylaminlösung Mehrverbrauch, als in der Tabelle angeführt, wird zwischen 49,0—15,0 ccm 0,1 mg Zucker und zwischen 15,0 bis 1,0 ccm 0,2 mg Zucker von dem entsprechenden Zuckerwerte subtrahiert.

Bestimmung des Zuckers durch Gärung.

a) Gewichtsanalytische Methoden.

Bei der Gärung des Zuckers entstehen als Hauptprodukte Kohlensäure und Alkohol, und teils durch das Verschwinden des Zuckers, teils durch die Entstehung des Alkohols nimmt das spezifische Gewicht des Harnes ab. Diese Methode besteht darin, daß man das spezifische Gewicht vor und nach der Gärung bestimmt.

Der zu prüfende Harn muß schwach sauer sein, wird nötigenfalls mit etwas Weinsäurelösung schwach angesäuert. Die Bestimmung des spezifischen Gewichtes des Harnes muß vor und nach der Gärung bei derselben Temperatur ausgeführt werden. Man bringt in einen Kolben etwa 200 ccm Harn und ein erbsengroßes Stück Preßhefe, die man durch Umschütteln in der Flüssigkeit zerteilt, verschließt den Kolben durch ein mit Wasser gefülltes U-Rohr und läßt die Probe bei Zimmertemperatur oder bei 20—25 ° C etwa 48 Stunden stehen. Hierauf filtriert man schnell durch ein Faltenfilter und bestimmt nun in dem zuckerfreien Harn das spezifische Gewicht. Eine Abnahme des spezifischen Gewichtes um 0,001 entspricht einem Zuckergehalte von 0,030 Proz.

Aus der Differenz folgt der Zuckergehalt nach der Formel:

$$x = \frac{D \times 0,030}{0,001}$$
 wo x die gesuchte Zuckermenge in Prozenten, D die gefundene Differenz bedeutet.

Lohnsteins Präzisions-Gärungssaccharimeter.

Man füllt die beigegebene Menge Quecksilber vollständig in den Apparat bei beiderseits offenem Rohr. Zur Ausführung der Zuckerbestimmung wird ein Stückchen Preßhefe in einem Schälchen mit dem 2—3fachen Volumen Wasser zu einem dünnen Brei verrieben, bringt mittels der dem Apparate beigegebenen mit dem Harn ausgespülten Pipette 0,5 ccm Harn auf die Oberfläche des Quecksilbers in die Kugel K. Nachdem man die Pipette dreimal mit gewöhnlichem Wasser sorgfältig gereinigt hat, fügt man mit der Pipette 2—4 Tropfen des Hefebreies zu dem Harn hinzu. Man befettet dann den Stöpsel mit dem dem Apparat beigegebenen Dichtungsmittel und setzt ihn auf den Hals der Kugel so, daß beide Löcher aufeinander kommen. Hierauf setzt man die Skala auf das Rohr des Apparates, stellt durch geringes Neigen des Apparates das Quecksilber auf Null und sperrt die äußere Luft durch Drehen des Stöpsels, wodurch die Quecksilbersäule auf dem Nullpunkt bleibt. Nun setzt man vorsichtig das Gewicht G auf den Stöpsel und überläßt den Harn im Apparat der Gärung entweder bei Zimmertemperatur (18—20 ° C), wobei der Gärungsprozeß, je nach der Zuckermenge, 8—12 Stunden dauert, oder bei 32—38 ° C im Brutschranke, wo die Gärung in 3—4 Stunden beendet ist. Man erkennt dies daran, daß die Quecksilbersäule in dem langen Schenkel nicht mehr steigt.

Zuckerbestimmung durch Polarisation.

Eiweißfreie zuckerhaltige Harne können nach der Filtration direkt polarisiert werden. Ist der Harn auch nach dem Filtrieren trübe oder sehr gefärbt, so schüttelt man ihn mit gepulvertem Bleiazetat und filtriert. Diese Methode setzt voraus, daß der Harn keine linksdrehenden Substanzen, wie Eiweiß, β -Oxybuttersäure, gepaarte Glukuronsäuren, sogen. Leoschen Zucker und in seltenen Fällen Zystin, enthält. Das Eiweiß entfernt man durch Koagulation, und die übrigen identifiziert man nach der Vergärung und darauffolgender Polarisation. β -Oxybuttersäure, gepaarte Glukuronsäuren, Leoscher Zucker vergären nicht.

Lävulose (Fruchtzucker).

Seliwanowsche Probe. 10 ccm Harn werden mit etwas Resorzin und 2 ccm verdünnter Salzsäure erhitzt. Bei Anwesenheit von Lävulose tritt sofort eine Rotfärbung ein, und nach kurzer Zeit scheidet sich ein dunkler Niederschlag, der in Alkohol mit schöner roter Farbe löslich ist.

Zum Nachweis der Lävulose eignet sich nach Neuberg¹⁾ am besten das Methylphenylhydrazin, das mit ihr das charakteristische Fruktosemethylphenylsazon vom Schmelzpunkt 153 ° C gibt.

Zur Abscheidung der Fruktose versetzt man den Harn mit Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaktion, enteißt, wenn nötig, dampft im Vakuum bei 40 ° C bis zur Sirupkonsistenz ein und fügt halb so viel 96prozentigen Alkohol zu, als das ursprüngliche Flüssigkeitsvolumen betrug. Nach dem Aufkochen wird die alkoholische Lösung mit Tierkohle entfärbt, auf 30 ccm eingeeengt und mit der aus der Titration berechneten Menge Methylphenylhydrazinazetat (3 Mol.) und eventuell noch so viel Alkohol versetzt, bis eine klare Mischung entsteht. Man erwärmt 3 Minuten auf dem Wasserbade und läßt stehen. Bei größeren Mengen Fruchtzucker kristallisiert das Methylphenylhydrazin nach 2—3 Stunden direkt oder nach Zugabe von etwas Wasser. Bei geringeren Fruchtzuckermengen scheidet sich das Osazon auf Zusatz von Wasser zuerst als Öl aus, das beim Reiben oder nach Impfung oder bei Abkühlung mit fester Kohlensäure und Äther erstarrt. Die Ausbeute beträgt etwa 66 Proz. der vorhandenen Fruktosemenge.

Milchzucker.

Nachweis. Kocht man 10 ccm Harn mit ebensoviel Bleizucker unter Zusatz von etwas Ammoniak 3—4 Minuten, so scheidet sich in Gegenwart von Milchzucker ein weißer Niederschlag aus, der bei Glukose fleischfarbig aussieht.

Malfatti-Woehlke empfehlen in der Weise zu verfahren, daß man 5 ccm der Harnprobe mit etwa 3 ccm starken Ammoniaks und 5 Tropfen Kalilauge versetzt und das Gemisch in ein heißes, nicht siedendes Wasserbad stellt, wobei nach 5 Minuten eine sich allmählich verstärkende Rotfärbung auftritt. Enthält der Harn neben Laktose auch Glukose, so erscheint die Färbung braun. Traubenzuckerhaltiger Harn reagiert nicht.

¹⁾ C. Neuberg und H. Strauß, Zeitschr. f. physiol. Chemie 36, 227 (1902).

Erhitzt man laktosehaltigen Harn mit Bleiessig unter Zusatz von Ammoniak, so entsteht nach Rubner Rotfärbung. Erhitzt man aber die Harnprobe nur bis 80° C, so wird die Farbe nicht rot, sondern gelb bis braun (Voit).

Enthält der Harn einen rechtsdrehenden, die Wismutlösung reduzierenden, nicht gärenden Zucker, so ist dies wahrscheinlich Milchzucker. Die Gärungsprobe auf Milchzucker geschieht am besten mit rein gezüchteter Hefe, *Saccharomyces apiculatus*, von der nur die Glukose, nicht aber der Milchzucker zer setzt wird.

Darstellung. Am sichersten ist der Nachweis des Milchzuckers durch seine Darstellung aus dem Harn, die nach Hofmeister in folgender Weise ausgeführt wird. Man fällt den Harn mit Bleizucker, filtriert, wäscht mit Wasser aus und fällt das Filtrat und Waschwasser mit Ammoniak. Die vom Niederschlage abfiltrierte Flüssigkeit wird abwechselnd mit Ammoniak und Bleizucker gefällt, bis keine optisch-aktive Substanz mehr in Lösung ist. Die vereinigten Niederschläge, mit Ausnahme des ersten, der keinen Zucker enthält, werden mit Wasser gut ausgewaschen, in der Kälte mit Schwefelwasserstoff zerlegt, filtriert, der überschüssige Schwefelwasserstoff durch einen Luftstrom verjagt, die im Filtrate frei gewordenen Säuren durch Schütteln mit Silberoxyd entfernt. Das überschüssige Silber wird aus dem Filtrate durch Schwefelwasserstoff entfernt, mit Bariumkarbonat versetzt, um etwa vorhandene freie Essigsäure zu binden, und auf dem Wasserbade eingedampft, bis ein dünnflüssiger Rückstand geblieben ist. Dieser wird mit so viel 90 prozentigem Alkohol versetzt, als noch ein flockiger, sich schnell absetzender Niederschlag entsteht, der abfiltriert wird. Das Filtrat scheidet beim Verdunsten im Exsikkator Kristalle von Milchzucker ab, die durch Umkristallisieren, Entfärbung mit Tierkohle und Auskochen mit 60—70 prozentigem Alkohol gereinigt werden.

Quantitative Bestimmung. Zur quantitativen Bestimmung des Milchzuckers bedient man sich seines Reduktionsvermögens. a) In 1 prozentiger Lösung reduzieren bei einer Kochdauer von sechs Minuten 0,5g Laktose 74,0ccm Fehlingscher Lösung; 1 ccm Fehlingscher Lösung entspricht 0,0076 g Milchzucker. b) 0,310 g Milchzucker in 1 prozentiger Lösung reduzieren 100 ccm Knappscher Lösung.

b) d-Galaktose.

Zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung der Galaktose im Harn dient ihre Drehung, Gärungsvermögen sowie Reduktionsfähigkeit, besonders geeignet ist das Phenyllosazon mit seinem charakteristischen optischen Verhalten. Von Milchzucker wird sie durch das Gärungsvermögen und das Galaktosemethylphenyllosazon unterschieden.

Als allgemeines Reagens auf Galaktosegruppen dient die Überführung in Schleimsäure. Diese stellt man dar, indem man 100 ccm Harn vom spezifischen Gewicht nicht über 1,020 mit 20 ccm, bei einem Harn mit höherem spezifischen Gewicht mit 25—35 ccm konzentrierter Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,4 in einem breiten Reagenzglas auf dem Wasserbade erhitzt, bis das Volumen 40—50 ccm beträgt und die Flüssigkeit hell geworden ist. Bei weiterem Einengen findet die eigentliche Oxydation der Galaktose unter Entwicklung gelbroter

Dämpfe statt, und bei der Konzentration von 20 cem beginnt schon in der Wärme die Ausscheidung der Schleimsäure, die nach 12 stündigem Stehen an einem kühlen Ort vollendet ist. Der Niederschlag wird auf ein Filter gebracht, mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen, getrocknet und evt. gewogen.

c) Pentosen.

Ein pentosehaltiger Harn wirkt etwas langsam auf die Kupfer- und Wismutlösung. Wenn nur Pentose zugegen ist, gärt der Harn nicht; bei gleichzeitiger Gegenwart von Glukose können geringe Pentosemengen vergären. Zum Nachweis der Pentosen dient das Osazon vom Schmelzpunkte 156—160 ° C (im reinen Zustande 166—168 ° C) und folgende Reaktionen.

Nachweis. Bialsche Reaktion. Man erhitzt 5 cem des Bialschen Reagens (1 g Orzin wird in 500 cem Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,151 und 25 Tropfen Eisenchloridlösung gelöst) zum Sieden und setzt zu der heißen Flüssigkeit etwa 5 cem des zu prüfenden Harnes hinzu, wobei eine grüne Färbung bei größerem Gehalte sofort auftritt, bei geringeren Mengen bald darauf, wobei sich ein dunkelgrüner Niederschlag allmählich abscheidet.

Die Reaktion von Tollens-Salkowski gründet sich darauf, daß die Pentosen beim Erwärmen mit Salzsäure ein Produkt geben, das sich mit Phlorogluzin rot färbt. Zur Ausführung dieser Reaktion löst man in einem Reagenzglas ein Körnchen Phlorogluzin in 5 cem Salzsäure, fügt 20 cem Harn hinzu, mischt gut durch und läßt in einem mit kochendem Wasser gefüllten Becherglas einige Minuten stehen. Bei Gegenwart von Pentosen bildet die Flüssigkeit einen roten Schaum.

Orzinprobe. Man mischt 5 cem Harn mit dem gleichen Volumen konzentrierter Salzsäure (1,19), fügt eine kleine Messerspitze Orzin hinzu und erhitzt zum Sieden. Es tritt eine grünliche Trübung auf, man kühlt dann die Flüssigkeit bis zur Lauwärme ab, schüttelt mit Amylalkohol aus und untersucht diese Lösung spektroskopisch. Die Ausscheidung des blaugrünen Farbstoffes ist an und für sich beweisend.

Quantitative Bestimmung s. S. 49.

Darstellung der r-Arabinose. Man dampft 20 Liter Harn im Vakuum auf 1 Liter ein, versetzt den Rückstand mit 6½ Liter Alkohol, filtriert von den ausgeschiedenen Salzen ab, befreit das Filtrat sowie die alkoholischen Extrakte der Salze vom Alkohol, entfärbt den Rückstand durch Kochen mit Tierkohle, entfernt durch Alkohol die Beimengungen und erwärmt das Filtrat mit 23 g Diphenylhydrazin. Es scheiden sich dabei Krusten und ein Brei von Nadeln aus, Arabinose-Diphenylhydrazon, die auf dem Filter mit kaltem Alkohol gewaschen und getrocknet, bei 206 ° C schmelzen und beim Erwärmen mit Formaldehyd und Pyridin die inaktive l-d- oder r-Arabinose liefert.

d) Inosit.

Nach Starkenstein¹⁾ wird der durch Koagulation vom Eiweiß befreite Harn mit Bariumnitrat und Silbernitrat versetzt, vom ausgefallenen Niederschlag abfiltriert, das Filtrat mit Natronlauge alkalisch gemacht und mit Natriumphosphat versetzt, um das Silber und Erdalkalien zu entfernen. Nach dem Filtrieren wird die Flüssigkeit mit

¹⁾ E. Starkenstein, Über Inositurie und die physiologische Bedeutung des Inosits. Zeitschr. f. experim. Pathol. und Therapie 5, 378 (1908). — Beziehungen der Zyklosen zum tierischen Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie 58, 162 (1908).

Essigsäure angesäuert, mit Bleizucker gefällt, das Filtrat vom Bleiazetatniederschlag ammoniakalisch gemacht und mit Bleiessig versetzt. Der nach 24 Stunden ausgeschiedene Bleiniederschlag wird abgesaugt, mit Wasser ausgewaschen, in Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das vom ausgeschiedenen Bleisulfid befreite Filtrat wird zur Trockne eingedampft, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen, mit starker Essigsäure angesäuert und bis zum dicken Sirup eingeengt. Der Rückstand wird in wenig Eisessig aufgenommen und mit absolutem Methyl- oder Äthylalkohol gefällt.

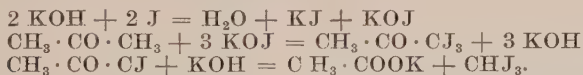
31. Azeton $C_3H_6O = CO \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$.

Eigenschaften. Das Azeton stellt eine dünnflüssige, angenehm obstartig riechende Flüssigkeit, die bei $56,5^\circ C$ siedet und leicht entzündlich ist, dar. Das spezifische Gewicht 0,8144, bei 20° 0,7920. Mit Wasser, Alkohol, Äther und Holzgeist ist es in jedem Verhältnis mischbar. Aus der wässrigen Lösung wird es durch Kalziumchlorid ausgeschieden; wasserfrei bildet es eine Chlor-kalziumdoppelverbindung, die durch Wasser zerlegt wird.

Nachweis. Légalsche Probe. Versetzt man einen azetonhaltigen filtrierten Harn, etwa 5 ccm, mit ebensoviele einer frisch bereiteten 5—10prozentigen Nitroprussidnatriumlösung und einigen Tropfen Natronlauge bis zur stark alkalischen Reaktion, so färbt sich die Flüssigkeit rubinrot. Da das Kreatinin dieselbe Farbe gibt, so übersättigt man mit konzentrierter Essigsäure, und die Farbe wird in Gegenwart von Azeton karminrot oder purpurrot, bei Anwesenheit des Kreatinins dagegen verschwindet die Färbung.

Enthält der zu prüfende Harn nur Spuren von Azeton, die leicht übersehen werden können, empfiehlt es sich, eine größere Menge Harn zu destillieren, bis der zehnte Teil übergegangen ist, säuert dann 100 ccm des Destillates mit Essigsäure resp. Salzsäure an und destilliert davon etwa 25 ccm ab. Mit diesem Destillat werden folgende Reaktionen angestellt.

Liebenschsche Jodoformprobe¹⁾. Diese Methode beruht darauf, daß Azeton durch Alkalien in Jodoform verwandelt wird:



5 ccm des Destillates werden mit Kalilauge deutlich alkalisch gemacht und dann mit so viel Lugolsche Lösung (Jodjodkaliumlösung) versetzt, bis die Mischung schwach braun ist, und gelinde erwärmt. Es scheidet sich bei Anwesenheit von Azeton Jodoform aus, das als gelber, kristallinischer, charakteristisch riechender Niederschlag ausfällt.

Da auch Aldehyd-Alkohol diese Probe geben, schlug Gunning²⁾ vor, diese Methode in der Weise zu modifizieren, daß man statt Jodjodkaliumlösung und Natronlauge eine alkoholische Jodlösung und Ammoniak anwendet. Es entsteht dann neben Jodoform ein schwarzer Niederschlag von Jodstickstoff, der jedoch allmählich verschwindet. Diese Methode zeigt noch 0,01 mg Azeton in 1 ccm Harn an.

Eine Verwechselung mit Alkohol ist kaum zu befürchten, wenn man die Reaktion in der Kälte anstellt, da der Alkohol unter solchen Bedingungen nur sehr träge mit alkalischer Jodlösung reagiert.

Die Quecksilberoxydprobe von Reynolds³⁾ basiert auf der Eigenschaft des Azetons, frisch gefälltes Quecksilberoxyd zu lösen. Fällt man eine Quecksilberchloridlösung mit alkoholischer Kalilauge, fügt die zu untersuchende Harnprobe hinzu und filtriert nach dem Umschütteln so oft durch ein sehr dichtes Filter, bis das Filtrat vollständig klar ist, so läßt sich bei Gegen-

¹⁾ A. Lieben, *Annalen d. Chemie und Pharmazie* **7**, Supplement, 236 (1870).

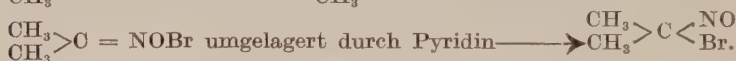
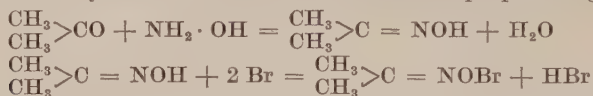
²⁾ Gunning, *Zeitschr. f. analyt. Chemie* **24**, 147 (1862).

³⁾ J. E. Reynolds, *Zeitschr. f. Chemie* **1871**, 254.

wart von Azeton im Filtrat Quecksilber mittels Schwefelammonium in Form eines braunen Ringes von Quecksilbersulfid nachweisen.

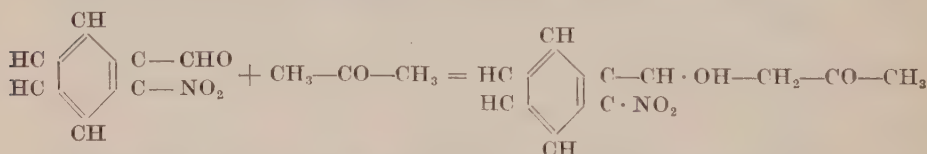
Die Probe von Denigès-Oppenheimer¹⁾ beruht auf der Bildung von Azeton mit Merkurisulfat. Reagens: 5 g reines Quecksilberoxyd werden in 20 g konzentrierter Schwefelsäure und 100 ccm Wasser gelöst und nach 24 Stunden filtriert. Davon setzt man tropfenweise dem Harn zu, solange ein Niederschlag entsteht (Eiweiß stört nicht). Klar filtriert, noch einige Tropfen Schwefelsäure zugesetzt und dann im verkorkten und mit Bindfaden verschnürten Fläschchen im Wasserbade erhitzt. Eine Trübung zeigt Spuren Azeton, ein weißer, in Salzsäure löslicher Niederschlag größere Mengen Azeton an. Der Niederschlag ist eine komplizierte Verbindung von Azeton mit HgSO_4 , durch deren Wägung man das Azeton auch quantitativ bestimmen kann (siehe S. 186).

Reaktion von Stock-Fröhner²⁾. Azeton bildet mit Hydroxylamin Azetoxin; dieses wird durch Brom substituiert und das so entstehende Produkt durch Pyridin zu tiefblauem Bromnitrosopropan umgelagert:

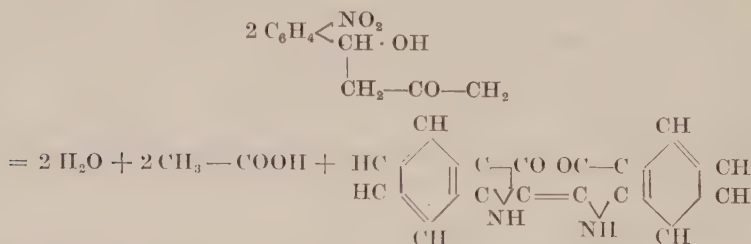


500 ccm Harn werden mit Essigsäure angesäuert und 5 ccm davon abdestilliert. Im Destillat wird ein Kristall Hydroxylaminhydrochlorid gelöst, die Lösung mit Chlorkalklösung versetzt und mit wenig Äther ausgeschüttelt. Dieser zeigt noch erkennbare schwache Blaufärbung, wenn zum (vorher negativ auf Azeton untersuchten) Harn 0,001 g Azeton in wässriger Lösung zugetügt wurden.

Die Probe von Pentzold³⁾. Zugrunde dieser Probe liegt die von Bayer und Drewsen⁴⁾ angegebene Synthese, nach der o-Nitrobenzaldehyd sich mit Azeton zu o-Nitrophenylmilchsäureketon kondensiert,



und letzteres durch Einwirkung von Alkalien unter Abspaltung von Wasser und Essigsäure in Indigo übergeht.



¹⁾ G. Denigès, Compt. rend. de l'Acad. de Sc. **126**, 1868 (1898); **127**, 963 (1898). — C. Oppenheimer, Berliner klinische Wochenschrift **36**, 828 (1899).

²⁾ O. Piloty und A. Stock, Chemische Berichte **35**, 3093 (1902). — Fröhner, Zur Stockschen Azetonreaktion. Deutsche mediz. Wochenschr. **27**, 79 (1901). — F. Blumenthal und C. Neuberg, Über Entstehung von Azeton aus Eiweiß. Deutsche mediz. Wochenschr. **27**, 6 (1901).

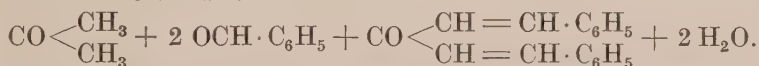
³⁾ Pentzold, Beiträge zur Lehre von der Azetonurie und von verwandten Erscheinungen. Archiv f. klin. Mediz. **34**, 132 (1884).

⁴⁾ Bayer und Drewsen, Darstellung von Indigblau aus o-Nitrobenzaldehyd. Chemische Berichte **15**, 2860 (1882).

Man löst in dem zu untersuchenden Harn etwas Orthonitrobenzaldehyd bei 50° C und versetzt die Flüssigkeit nach dem Erkalten mit Natronlauge, wobei sie sich zuerst gelb färbt, bei größeren Azetonmengen bald grün. Schüttelt man mit Chloroform, so färbt sich dieses blau. Diese Probe läßt nur 0,1 Proz. Azeton mit Sicherheit erkennen.

Darstellung. Deichmüller ¹⁾ empfiehlt folgendes Verfahren zur Darstellung größerer Mengen Azeton aus Harn. Man destilliert je 2 Liter Harn mit kleiner Flamme, bis der zehnte Teil übergegangen ist und sammelt so etwa 4 Liter Destillat. Dieses reagiert stark ammoniakalisch und ist durch die übergeschäumten Karbonate stark getrübt; man unterwirft es der mehrmaligen Destillation, bis die übergehende Flüssigkeit keine Liebensche Reaktion mehr gibt. Nun sättigt man das Destillat mit Pottasche, hebt die ölige Schicht ab, entfernt den Alkohol mit frisch getrocknetem porösen Chlorkalzium, läßt einige Tage stehen und destilliert. Durch fraktionierte Destillation erhält man Azeton vom richtigen Siedepunkt. Durch Überführung in die Bisulfitverbindung kann es weiter gereinigt werden.

Vorländer und Hobohm ²⁾ benutzen zur Darstellung des Azetons seine Eigenschaft, durch Kondensation mit Benzaldehyd in alkalischer Lösung das schön kristallisierende Dibenzalazeton vom Schmelzpunkte 112° C zu bilden:



Man destilliert den Harn in der oben angegebenen Weise, bis kein Azeton mehr übergeht, unterwirft das Destillat einer nochmaligen Destillation, fängt die übergehende Flüssigkeit in Reagenzgläsern auf, fügt in jedes Reagenzglas 2 ccm einer 10 prozentigen Natronlauge und 2—3 Tropfen Benzaldehyd zu, schüttelt gut durch und läßt gut verschlossen bei Zimmertemperatur 24 Stunden stehen. Die anfangs ausgeschiedenen Öltropfen verdichten sich zu Kristallaggregaten, die man durch ein gehärtetes Filter absaugt und mit heißem Wasser bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion auswäscht und kristallisiert aus heißem Alkohol unter vorsichtiger Zugabe von heißem Wasser um.

Quantitative Bestimmung. Die quantitative Bestimmung des Azetons erstreckt sich auf das im Harn präformierte und bei der Destillation aus der Azetessigsäure sich abspaltende Azeton, d. h. auf die Gesamtazetonmenge.

Jodometrische Methode von Messinger³⁾.

Man versetzt 100 ccm Harn in einem etwa 500 ccm fassenden Destillierkolben mit 2 g fein gepulverter Oxalsäure oder 3 g Weinsäure und 100 ccm destillierten Wassers und destilliert in einen gleich großen, mit 100 ccm eiskaltem Wasser beschickten Destillationskolben als

¹⁾ Deichmüller, Über diabetische Azetonurie. Liebig's Annalen d. Chem. 209, 22 (1881).

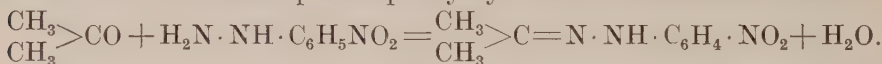
²⁾ Vorländer und Hobohm, Über die Kondensation von Ketopentamethylen mit Aldehyden. Chemische Berichte 29, 1840 (1896).

³⁾ J. Messinger, Chemische Berichte 21, 3366 (1888).

Vorlage etwa die Hälfte über. Das Destillat versetzt man mit etwa 3 g reinem Kalzium- oder Magnesiumkarbonat, schüttelt vorsichtig um und destilliert langsam und unter starker Kühlung wieder die Hälfte ab, wobei als Vorlage eine etwa 300 ccm fassende, mit 60 ccm Eiswasser beschickte Stöpselflasche dient. Das so erhaltene Destillat wird mit 30 ccm einer 33prozentigen Kalilauge und einem Überschuß von $\frac{1}{10}$ -Normaljodlösung, den man an der Entstehung einer Gelbbraunfärbung beim Einfallen eines Tropfens verdünnter Salzsäure erkennt, versetzt, schüttelt tüchtig durch und läßt 10 Minuten stehen. Dann wird die mit Salzsäure vorsichtig angesäuerte Flüssigkeit mit $\frac{1}{10}$ -Normalthiosulfatlösung unter Benutzung einer Stärkelösung als Indikator titriert. 1 ccm $\frac{1}{10}$ -Normaljodlösung entspricht 0,000967 g Azeton.

Bestimmung des Azetons als p-Nitrophenylhydrazon.

Zugrunde dieser Methode liegt die zuerst von Bamberger und Sternitzki ¹⁾ beobachtete Bildung von Azeton-p-Nitrophenylhydrazon beim Lösen von festem p-Nitrophenylhydrazin in wasserfreiem Azeton:



W. van Ekenstein und J. Blanksma ²⁾ benutzten diese Reaktion zur quantitativen Bestimmung des Azetons. W. de Graaf und S. Möller bearbeiteten diese Methode für den Harn.

Graaf ³⁾ destilliert 200 ccm Harn bis auf ungefähr 10 ccm ab, fängt das gut gekühlte Destillat in 50 ccm destilliertem Wasser auf und fällt das Azeton im Destillat mit einer Lösung von 0,4—0,5 g p-Nitrophenylhydrazin in 10 ccm einer 30-prozentigen Essigsäure. Den in Form von zusammenhängenden schweren Flocken ausgefallten Niederschlag sammelt er auf einem gewogenen Filter, wäscht mit destilliertem Wasser aus, trocknet bei 105—110° C und wägt nach dem Erkalten im Exsikkator. — 193 mg Azeton-p-Nitrophenylhydrazon entsprechen 58 mg Azeton.

Möller ⁴⁾ verbessert diese Methode, indem er 200 ccm Harn mit 5 ccm einer 33prozentigen Schwefelsäure versetzt, die Hälfte abdestilliert, das Destillat mit einer klaren Lösung von $\frac{1}{2}$ —1 g p-Nitrophenylhydrazin in 33prozentiger Essigsäure versetzt und 30 Minuten stehen läßt. Den dabei entstandenen Niederschlag bringt er auf ein gehärtetes, getrocknetes und gewogenes Filter und trocknet bei 80° C bis zur Gewichtskonstanz. — 1 g Azeton-p-Nitrophenylhydrazon entspricht 0,3 g Azeton. Für je 100 ccm der gefällten Lösung addiert man als Korrektur 0,006 g Hydrazon.

¹⁾ E. Bamberger und H. Sternitzki, Weiteres über Dihydromethylketol. *Chemische Berichte* **26**, 1306 (1893).

²⁾ W. A. van Ekenstein und J. J. Blanksma, Sur quelques hydrazones dérivés des nitrophenylhydrazines ortho, meta et para. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **24**, 33 (1905).

³⁾ W. C. de Graaf, *Pharmaceutisches Weekblad* **44**, 555 (1907).

⁴⁾ S. Möller, Über Azetonbestimmung im Harn. *Zeitschr. f. klin. Medizin* **64**, 207 (1907).

Bestimmung des Azetons nach Denigès und Oppenheimer.

Das Prinzip der von Denigès benutzten Methode besteht in der Fällung des Azetons durch Quecksilberoxyd in stark schwefelsaurer Lösung als eine Quecksilberkomplexverbindung von der Zusammensetzung $(\text{HgSO}_4)_2 \cdot 3 \text{ HgO} \cdot \text{CO}(\text{CH}_3)_2$ und nach dem Trocknen bei 110°C $[(\text{HgSO}_4)_2 \cdot 3 \text{ HgO}]_3 \cdot (\text{COC}_2\text{H}_5)_4$. Oppenheimer fand bei der Nachprüfung dieser Angabe, daß der Körper bei 110°C auch während mehrerer Tage unverändert bleibt, d. h. keinen Gewichtsverlust erleidet. Bei seiner Darstellungsweise fand Oppenheimer die Zusammensetzung $5 \text{ HgSO}_4 \cdot 7 \text{ HgO} \cdot 3 \text{ CO}(\text{CH}_3)_2$.

Die Bestimmung führt man nach Oppenheimer in folgender Weise aus. Je nach dem Ausfall der qualitativen Reaktion (s. dort) wendet man 5—25 ccm Harn an, den man mit Quecksilberreagens fällt, und filtriert. Das Filtrat säuert man mit Schwefelsäure an und setzt einen großen Überschuß von schwefelsaurer Quecksilberlösung, bei geringen Azetonmengen etwa 25 ccm, bei größeren Mengen 30 ccm, und 25—30 ccm Wasser hinzu. Das Gemisch bringt man in eine dickwandige Flasche mit Glasstöpsel, die man fest verschnürt und $\frac{1}{2}$ Stunde im siedenden Wasserbade erhitzt. Den Niederschlag sammelt man auf einem getrockneten und gewogenen Filter oder in einem mit Asbest beschickten Goochtiegel, wäscht mit kaltem Wasser aus, bis das ablaufende Wasser nicht mehr sauer reagiert, dann mit Alkohol und Äther und trocknet bei 105 — 110°C bis zur Gewichtskonstanz. Das so erhaltene Gewicht muß man entsprechend der oben erwähnten Formel mit 0,055 multiplizieren, um die Azetonmenge zu ermitteln.

Bestimmung des Azetons im Harn aus dem spezifischen Gewicht nach L. Willen¹⁾.

Man versetzt 300—500 ccm Harn mit 30—50 ccm 20prozentiger Schwefelsäure, destilliert, fängt die ersten 60 ccm des Destillates, die alles Azeton enthalten, auf und bestimmt darin das spezifische Gewicht bei 15°C (Azeton = $D_{15}^{20} 0,8008$). Nach folgender Tabelle läßt sich der Azetongehalt quantitativ ermitteln.

Spezifisches Gewicht bei 15°C	Azetongehalt im wässrigen Destillat o/o	Spezifisches Gewicht bei 15°C	Azetongehalt im wässrigen Destillat o/o
0,9999	0,25	0,9976	2,00
0,9996	0,50	0,9969	2,50
0,9993	0,75	0,9961	3,00
0,9988	1,00	0,9949	4,00
0,9983	1,50	0,9936	5,00

32. Azetessigsäure (Azetonmonokarbonsäure)



Eigenschaften. Die Azetessigsäure ist eine farblose, stark saure Flüssigkeit, die sich mit Wasser, Alkohol und Äther in jedem Verhältnis mischt und

¹⁾ L. Willen, Schweiz. Wochenschr. f. Pharmazie **34**, 433 (1897).

in Chloroform unlöslich ist. Beim Erhitzen, wie beim Kochen mit Wasser und besonders mit Säuren, zerfällt sie in Kohlensäure und Azeton und gibt deshalb die Azetonreaktionen. Von dem Azeton unterscheidet sie sich dadurch, daß sie mit verdünnter Eisenchloridlösung eine violettrote oder braunrote Farbe annimmt. Wegen ihrer leichten Zersetzlichkeit ist es recht schwierig, sie in freiem Zustande darzustellen.

Nachweis. Reaktion von Gerhardt ¹⁾. 5—10 ccm Harn werden so lange mit Eisenchloridlösung versetzt, bis ein Niederschlag von Eisenphosphat ausfällt, dann wird filtriert und noch etwas Eisenchlorid hinzugefügt, wobei die Farbe bordeauxrot wird. Die Farbe verschwindet nach 24 Stunden, beim Erhitzen sofort. Eine Rotfärbung mit Eisenchlorid erhält man aber auch mit Ameisensäure, Essigsäure, Salizylsäure, Phenol, Rhodanwasserstoff; in allen diesen Fällen tritt die Färbung auch nach dem Aufkochen des Harnes auf, während sie bei Gegenwart von Azetessigsäure nicht mehr eintritt. Um die Azetessigsäure neben diesen Säuren nachzuweisen, schüttelt man den angesäuerten Harn mit Äther und versetzt die ätherische Lösung mit einer verdünnten wässerigen Eisenchloridlösung, wobei keine Rotfärbung eintritt, wenn die Reaktion durch die Gegenwart von Ameisensäure oder Essigsäure bedingt war. Ist Rhodanwasserstoff zugegen, so wird die ätherische, bei Gegenwart von Azetessigsäure die wässrige Schicht rot gefärbt.

Reaktion von Arnold ²⁾. Diese Probe beruht auf einer Färbung, die die Azetessigsäure mit p-Diazoazetophenonchlorid liefert, wobei Azetophenon-p-Azoazetessigsäure entsteht. Zur Ausführung dieser Probe sind folgende Lösungen nötig:

a) eine Lösung von 1 g p-Aminoazetophenon in 2 ccm konzentrierter Salzsäure und 100 ccm Wasser, die wasserklar und vor Einwirkung des direkten Sonnenlichtes geschützt sein muß, und b) eine 1prozentige Natriumnitritlösung. Das Reagens besteht aus 2 Teilen von a und einem Teil von b.

Versetzt man dieses Reagens mit dem gleichen Volumen des zu prüfenden Harnes und mit einigen Tropfen konzentrierten Ammoniaks, so entsteht bei allen Harnen eine mehr oder weniger intensive braunrote Färbung. Wird ein aliquoter Teil dieser braunroten Lösung mit einem großen Überschuß von konzentrierter Salzsäure versetzt, so färbt sich diese Mischung bei Gegenwart von Azetessigsäure prachtvoll purpurviolett, und um so intensiver, je mehr Azetessigsäure vorhanden ist. Bei Abwesenheit von Azetessigsäure schlägt die braune Färbung auf Zusatz von Salzsäure in rein Gelb um.

Diese Probe zeichnet sich durch ihre Schärfe und absolute Eindeutigkeit aus, da sie mit keiner anderen im Harn vorkommenden Substanz, auch nicht mit Azeton und β -Oxybuttersäure positiv ausfällt.

Die Probe von Liplawsky ³⁾ ist eine Modifikation der Arnoldschen Reaktion, zeichnet sich aber durch ihre bedeutend höhere Empfindlichkeit aus, die noch bei einer Verdünnung von 1 : 40000 die Azetessigsäure deutlich nachweist. Phenole und Salizylsäure stören die Reaktion nicht.

6 ccm einer mit Salzsäure angesäuerten 1prozentigen Lösung von p-Amidoazetophenon und 3 ccm einer 1prozentigen Kaliumnitritlösung werden mit dem gleichen Volumen Harn vermischt, dann mit einem Tropfen konzentrierten Ammoniaks versetzt und geschüttelt, wobei eine ziegelrote Färbung entsteht. Hierauf versetzt man 2 ccm von dieser ziegelroten Lösung mit 15—20 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19, 3 ccm Chloroform und 2—4 Tropfen Eisenchloridlösung und mischt langsam durch, ohne zu schütteln — nach einer Minute färbt sich die Chloroformschicht in Gegenwart von Azetessigsäure violett bis marineblau. Diese Farbe zeichnet sich durch eine wochenlange Lichtbeständigkeit aus.

Nachweis von Azeton und Azetessigsäure im Harn. Der Prüfung auf Azeton muß eine Prüfung auf Azetessigsäure vorangehen, und da diese Säure beim Stehen des Harnes zersetzt wird, so muß der Harn in absolut frischem

¹⁾ Gerhardt, Über Diabetes mellitus und Azeton. Wiener medicin. Presse 6, 28 (1865).

²⁾ Arnold, Eine neue Reaktion zum Nachweis der Azetessigsäure im Harn. Wiener klinische Wochenschrift Nr. 20 (1899). — Über Nachweis und Vorkommen der Azetessigsäure im pathologischen Harn. Zentralbl. f. innere Medizin 21, 417 (1900).

³⁾ S. Liplawsky, Deutsche mediz. Wochenschrift 27, 151 (1901).

Zustande untersucht werden. Der Nachweis von Azeton bei Gegenwart von Azetessigsäure geschieht in der Weise, daß man den Harn schwach alkalisch macht und in einem Scheidetrichter mit alkohol- und azetonfreiem Äther schüttelt, dann die abgehobene ätherische Schicht mit Wasser schüttelt, das das Azeton aufnimmt, und das Wasser prüft.

Reaktion von Riegler¹⁾. Diese Reaktion beruht auf dem Vermögen der Azetessigsäure, Jod zu binden. Freie Jodsäure wird durch verschiedene Harnbestandteile, besonders durch Harnsäure, unter Freiwerden von Jod reduziert, das von der Azetessigsäure auch bei saurer Reaktion gebunden wird. Fügt man also zu einem azetessigsäurefreien Harn Chloroform hinzu, so wird er durch das ausgeschiedene Jod gefärbt, ein azetessigsäurehaltiger Harn bleibt dagegen farblos.

Man versetzt 1—2 ccm normalen Harn mit 2 ccm einer 10prozentigen Jodsäurelösung und 3 ccm Chloroform und schüttelt durch, wodurch das Chloroform violett gefärbt wird. Fügt man zu dieser Mischung den zu prüfenden Harn und schüttelt gut durch, so entfärbt sich die Chloroformschicht in Gegenwart von Azetessigsäure, bei Abwesenheit färbt sich das Chloroform noch intensiver.

Da die Rieglersche Probe nur bei saurer Reaktion zu einem positiven Resultat führen kann, so schlägt Lindemann²⁾ vor, die eventuelle alkalische Reaktion des Harns zu neutralisieren, indem er 10 ccm des zu untersuchenden Harnes mit 5 Tropfen verdünnter Essigsäure ansäuert und dann 5 Tropfen Lugolscher Jodlösung (1 Teil Jod, 2 Teile Jodkalium in 100 Teilen Wasser) 2 ccm Chloroform hinzufügt und gut durchschüttelt; bei Anwesenheit von Azetessigsäure bleibt der Chloroformauszug farblos.

Quantitative Bestimmung. Eine Methode zur direkten Bestimmung der Azetessigsäure ist nicht bekannt. Die vorgeschlagenen Methoden ermöglichen die Ermittlung der Azetessigsäuremenge auf indirektem Wege, d. h. aus der Differenz zwischen dem Gesamtazeton und dem präformierten oder dem aus der Azetessigsäure abgespaltenen. Das Prinzip der vorgeschlagenen Methoden beruht auf der leichteren Flüchtigkeit des Azetons bei niedriger Temperatur, wo die Azetessigsäure nicht zerfällt.

Embden und Schliep³⁾ bestimmen die Azetessigsäure, indem sie in einem aliquoten Teil des zu untersuchenden Harnes die Menge des Gesamtazetons nach der Messinger-Huppertschen Methode ermitteln. In einem anderen gleich großen Teil Harn entfernen sie das präformierte Azeton durch Destillation im Vakuum und bestimmen im Rückstande die von der Spaltung der Azetessigsäure herrührende Azetonmenge nach derselben Methode und erhalten so aus der Differenz die Menge des präformierten Azetons.

Zur Ausführung der Bestimmung bringt man 20 ccm, bei azetonreichem Harn 10 ccm in einen mit 130—150 ccm destilliertem Wasser beschickten, 2 Liter fassenden Rundkolben, der mit der Vorlage mittels eines langen Liebig'schen Kühlers verbunden ist, und destilliert bei möglichst hohem Vakuum auf einem Wasserbade mit einer 34—35 ° C nicht übersteigenden Temperatur etwa 30—35 Minuten, bis mindestens

¹⁾ Riegler, Neuere Reaktionen auf Azetessigsäure im Harn. Wiener mediz. Blätter 25, 227 (1902); 26, 267 (1903). Münchner mediz. Wochenschrift 53, 448 (1906). Zeitschr. f. klin. Medizin 54, 350 (1904).

²⁾ Lindemann, Zum Nachweis der Azetessigsäure im Harn. Münchner mediz. Wochenschrift 52, 1386 (1905); 53, 1019 (1906).

³⁾ Embden und Schliep, Über getrennte Bestimmung von Azeton- und Azetessigsäure. Zentralbl. f. d. ges. Physiol. und Pathol. d. Stoffwechsels, N. F., 2, 250—289 (1907).

55—60 cem Flüssigkeit in die mit Eis gekühlte Vorlage übergegangen sind; während der Destillation wird mittels einer Kapillare ein langsamer Luftstrom durchgesaugt.

Die Methode von Folin¹⁾, modifiziert von Stuart Hart²⁾, besteht darin, daß man 20—25 cem Harn in dem Verdampfungsgefäß, das mit einer mit 10 cem einer 40prozentigen Kalilauge, etwas Wasser und einem Überschuß einer $\frac{1}{10}$ -Normaljodlösung beschickten Vorlage verbunden ist, mit 0,2—0,3 g Oxalsäure oder einigen Tropfen einer 10prozentigen Phosphorsäurelösung ansäuert, mit 8—10 g Natriumchlorid und einer Spur Petroleum versetzt. Hierauf saugt man während 20—25 Minuten mit einer Wasserstrahlpumpe einen kräftigen Luftstrom durch, wobei alles freie Azeton übergeht und sich in Jodoform verwandelt. Das Destillat wird mit Salzsäure stark angesäuert und der Überschuß von Jod mit Thiosulfatlösung und Stärke als Indikator zurücktitriert. Im rückständigen Harn kann auf Zusatz von Phosphorsäure das beim Kochen neugebildete Azeton in der üblichen Weise bestimmt werden.

33. β -Oxybuttersäure



Eigenschaften. Die β -Oxybuttersäure bildet einen geruchlosen Sirup, kristallisiert aber auch in glashellen, plattenförmigen Kristallen, die bei 47,5 bis 48° C sintern und bei 49—50° C schmelzen. Sie löst sich leicht in Wasser, Alkohol, Holzgeist, Azeton, Äther und Essigester, ist in Benzol und Liproin unlöslich. Die aus Harn gewonnene Säure wie ihre Salze sind linksdrehend; die Linksdrehung der freien Säure ist größer als die ihrer meisten Salze, sie beträgt $[\alpha]_{\text{D}}^{17-22} = 24,12^\circ$ für Konzentrationen bis 12 Proz., sie wirkt also bei der Bestimmung des Zuckers störend. Die Säure wird weder von Bleiessig noch von ammoniakalischem Bleiessig gefällt und vergärt nicht. Beim Sieden mit Wasser, besonders bei Gegenwart von Mineralsäure, zersetzt sie sich in die bei 71 bis 72° C schmelzende α -Krotonsäure und Wasser: $\text{CH}_3 \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH} = \text{CH}_3 \cdot \text{CH} : \text{CH} \cdot \text{COOH} + \text{H}_2\text{O}$. Bei der Oxydation mit Chromsäuremischung liefert sie Azeton.

Nachweis. Ist ein Harn nach dem Vergären mit Hefe linksdrehend, so ist das Vorhandensein von β -Oxybuttersäure wahrscheinlich.

Den so vergorenen Harn (diese Probe kann auch direkt im Harn angestellt werden) verdampft man in größerer Menge bis zur Sirupkonsistenz und destilliert nach Zusatz des gleichen Volumens konzentrierter Schwefelsäure ohne Kühler, wobei α -Krotonsäure übergeht, die man unter starker Kühlung in einem Reagenzrohre auffängt. Die α -Krotonsäure scheidet sich in Kristallen vom Schmelzpunkte + 72° C aus. Scheiden sich keine Kristalle aus, so schüttelt man das Destillat mit Äther, läßt diesen verdunsten, wäscht den Rückstand mit Wasser und bestimmt den Schmelzpunkt.

Man kann auch nach dem Vergären des Harnes alle linksdrehenden Substanzen außer der Oxybuttersäure durch Fällen mit Bleiazetat und Ammoniak entfernen. Die Linksdrehung des Filtrates zeigt, je nach ihrer Größe, die entsprechende Menge der vorhandenen β -Oxybuttersäure an (Külz)³⁾.

¹⁾ Folin, On the separate Determination of Acetone and Diacetic in Diabetic Urines. *Journal of biological Chemistry* **3**, 177 (1907).

²⁾ P. Stuart Hart, *Journ. of biolog. Chemistry* **4**, 473 u. 477 (1908); *Chem. Zentralbl.* **1908**, II, 985.

³⁾ E. Külz, Über eine neue linksdrehende Säure (Pseudooxybuttersäure), ein Beitrag zur Kenntnis der Zuckerharnruhr. *Zeitschr. f. Biologie (N. F.)*

Die optische Untersuchung des mit Bleiessig und Ammoniak ausgefällten Harnes ist neuerdings als unzuverlässig erkannt, da nach H. Großmann¹⁾ die Drehung der β -Oxybuttersäure durch Bleisalze und Alkali aufgehoben werden kann. Es empfiehlt sich daher, das Ammoniak zu verjagen und das Blei bei saurer Reaktion mit Schwefelwasserstoff zu entfernen.

Black bediente sich zum Nachweis der β -Oxybuttersäure ihrer von Dakin zuerst beobachteten Eigenschaft, mit Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalz u. a. Azetessigsäure, Azeton usw. zu liefern. Er dampft 10—20 ccm Harn auf dem Wasserbade bis auf $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{4}$ des Volumens ein, wobei die präformierte Azetessigsäure in Azeton und Kohlensäure zerfällt, macht den Rückstand mit konzentrierter Salzsäure deutlich sauer und verrührt mit zu einem dünnen Brei, der in kurzer Zeit erhärtet. Die fein gepulverte Masse extrahiert er dann zweimal mit Äther, verdampft den Äther, löst den Rückstand in Wasser, neutralisiert die Lösung mit Bariumkarbonat und versetzt mit 2—3 Tropfen 3prozentigen Wasserstoffsuperoxyds. Beim Versetzen dieser Lösung mit einigen Tropfen einer 5prozentigen Ferrichloridlösung, die eine Spur Ferrosulfat enthält, tritt nach kurzer Zeit eine dunkelrote Färbung ein, die bei längerem Stehen verblaßt.

Isolierung reiner β -Oxybuttersäure aus Harn.

Nach Magnus-Levy²⁾ wird der frische Harn mit je 300—400 g, Ammoniumsulfat und je 100—150 ccm 20prozentiger Schwefelsäure pro Liter versetzt und in einem Extraktionsapparat mit Äther erschöpft, wozu 24—72 Stunden erforderlich sind, je nach der Menge der β -Oxybuttersäure. Hierauf wird der Ätherauszug zur Entfernung etwa vorhandener Mineralsäuren mit geringen Mengen Wasser ausgeschüttelt, der Äther verdunstet, wobei sich ein Teil der Hippursäure ausscheidet während der Rest durch Zusatz von Wasser ausfällt. Die von der ausgeschiedenen Hippursäure abfiltrierte wässrige Lösung wird durch Destillation mit Wasserdampf von den flüchtigen Fettsäuren befreit, mit Natronlauge neutralisiert, mit Tierkohle entfärbt und eingedampft, wobei ein Kristallbrei zurückbleibt, den man durch Alkohol entwässert und aus absolutem Alkohol, zuletzt mit Hilfe von Äther, mehrmals umkristallisiert. Aus dem so erhaltenen Natriumsalz wird die freie β -Oxybuttersäure durch Versetzen der konzentrierten Lösung mit Schwefelsäure als ein farbloser Sirup erhalten. Die Kristallisation der sirupösen β -Oxybuttersäure gelingt nur bei einem äußerst geringen Wassergehalte, ferner durch Impfkristalle, sowie beim Reiben durch die ganze Masse unter beträchtlicher Temperaturerhöhung bis zum Schmelzpunkte der Säure. Die Trennung der Kristalle von der Mutterlauge erfolgt durch Aufstreichen auf Tonplatten im Exsikkator. Zur Reinigung wird die Säure in Wasser oder Äther gelöst und geimpft, bis sie den richtigen Schmelzpunkt von 49—50° C zeigt.

Ungleich wirksamer ist nach Fischer und Scheibler³⁾ als Reinigungsverfahren die Verwandlung der Rohsäure in den Methyl-

20, 165 (1884); 23, 329 (1887). — Zur Kenntnis der linksdrehenden Oxybuttersäure. Archiv f. experim. Pathol. und Pharm. 13, 291 (1884).

¹⁾ H. Großmann, Über die Bedeutung von Bleisalzen für die polarimetrische Untersuchung des Harnes und der Gewebesaft. Biochem. Zeitschr. 1, 339 (1909).

²⁾ A. Magnus-Levy, Die Azetonkörper. Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde 1, 416 (1908).

³⁾ E. Fischer und H. Scheibler, Zur Kenntnis der Waldenschen Umkehrung. Chemische Berichte 42, 1219 (1909).

ester, der unter geringem Druck ganz ohne Zersetzung siedet, von den übrigen Bestandteilen leicht zu trennen ist und sich auch ohne Schwierigkeit in die Säure bzw. ihr Natriumsalz zurückverwandeln läßt.

25 g Rohsäure (erhalten nach dem Verfahren von Magnus-Levy) werden mit 125 ccm Methylalkohol vermischt und unter Kühlung mit Eis gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Nach 24stündigem Stehen wird die Mischung unter 15—20 mm Druck bei gut gekühlter Vorlage aus einem Bade von 20—25 ° C verdampft. Den Rückstand verdünnt man mit dem doppelten Volumen Äther, filtriert vom ungelösten wasserhaltigen Teil, trocknet dann die ätherische Lösung 12 Stunden mit Natriumsulfat, verdampft den Äther unter vermindertem Druck und destilliert den Rückstand bei etwa 13 mm Druck aus einem Bade, dessen Temperatur bis 85 ° C gesteigert wird. Der Ester destilliert unter diesen Bedingungen zwischen 66 und 70 ° C und bildet eine schwach grünlich gefärbte Flüssigkeit. Der im Destillationskolben zurückbleibende braune Sirup wird der Veresterung und Destillation noch zweimal unterworfen, wodurch dann der größte Teil der Oxybuttersäure in Ester verwandelt wird. Für die völlige Reinigung des Esters wird er nochmals mit Natriumsulfat und einer ganz kleinen Menge Silberkarbonat 12 Stunden geschüttelt und von neuem destilliert, wobei der Verlust sehr unbedeutend ist.

Das reine β -oxybuttersäure Natrium erhält man, wenn man 1 g Methylester mit wenig Alkohol vermischt, unter Kühlung 25,5 ccm alkoholische $\frac{1}{2}$ -Normallauge zugibt und 12 Stunden stehen läßt, dann zur Neutralisation der überschüssigen Natronlauge 4,25 ccm Normal-schwefelsäure zufügt und das abgeschiedene Natriumsulfat abfiltriert. Beim Verdampfen der Mutterlauge bleibt das Natriumsalz der β -Oxybuttersäure zurück und wird zur Entfernung des darin enthaltenen Wassers in einer Platinschale mit Alkohol mehrmals abgedampft, dann wieder in Alkohol gelöst und die auf etwa 5 ccm konzentrierte Flüssigkeit unter Schütteln allmählich mit 20 ccm Äther versetzt, wobei das Natriumsalz als eine gallertähnliche Masse ausfällt, die abfiltriert und zwischen gehärtetem Filtrierpapier abgepreßt wird. Die freie Säure erhält man durch Zerlegen des Natriumsalzes mit Schwefelsäure und Ausschütteln mit Äther.

Quantitative Bestimmung. Die zur quantitativen Bestimmung der β -Oxybuttersäure angewandten Verfahren beruhen auf folgenden Eigenschaften der Säure. a) der Überführung in α -Krotonsäure, b) die optische Aktivität, c) die Oxydation zu Azeton mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure.

a) Überführung in α -Krotonsäure.

Die von Darmstaedter ¹⁾ angegebene Methode hat, wie die späteren Untersuchungen verschiedener Autoren, wie Shindo, Mag-

¹⁾ E. Darmstaedter, Die quantitative Bestimmung der β -Oxybuttersäure im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie **37**, 355 (1903).

nus-Levy, Embden, Ernst, Schmitz, ergeben haben, zu keinen nur annähernd quantitativen Resultaten geführt.

Shindo ¹⁾ sucht die Verluste an Krotonsäure, die bei dem Verfahren von Darmstaedter bei dem Erwärmen auf 160° C zur Entfernung der Fettsäuren entstehen, dadurch zu beseitigen, daß er statt mit Natronlauge zu titrieren die Additionsfähigkeit der Krotonsäure für Brom benutzt, also die Entfernung der Fettsäuren überflüssig macht und daß er die für Brom ebenfalls reaktionsfähigen Phenole durch Bariumkarbonat entfernt. Er verfährt in folgender Weise. Man macht 150—200 ccm Harn mit Natriumkarbonat schwach alkalisch und dampft auf dem Wasserbade fast bis zur Trockne ein, den Rückstand destilliert man in einem Kolben mit 150—200 ccm einer 50—55prozentigen Schwefelsäure unter Ersatz der abdestillierten Flüssigkeit durch Wasser so lange, bis 400 ccm Flüssigkeit in die Vorlage übergegangen sind. Das so erhaltene Destillat neutralisiert man mit Bariumkarbonat und dampft in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade ein, den Rückstand nimmt man mit Wasser auf, filtriert und wäscht mehrmals mit Wasser nach. Das mit Salzsäure angesäuerte Filtrat versetzt man mit titriertem Bromwasser und läßt 10 Minuten stehen, wobei die Flüssigkeit gelb bleiben muß, andernfalls fügt man noch etwas Bromwasser hinzu. Der Bromüberschuß wird nun mit Jodkalium und Thiosulfatlösung zurücktitriert. Ein Molekül Krotonsäure addiert 2 Atome Brom, also 86 g Krotonsäure addieren so viel Brom, wie 2 Liter $\frac{1}{6}$ -Normalthiosulfatlösung entspricht; 1 ccm $\frac{1}{6}$ -Normalthiosulfatlösung entspricht $\frac{86}{2000} = 0,0043$ g Krotonsäure = 0,0052 g β -Oxybuttersäure.

b) Polarimetrische Bestimmung.

Das Prinzip der in Vorschlag gebrachten polarimetrischen Bestimmungsmethoden der β -Oxybuttersäure im Harn beruht im wesentlichen auf der Isolierung der Säure durch Äther entweder direkt aus dem eingetrockneten oder vorher mit besonderen Trockenmitteln behandelten Harn, Lösung des Ätherrückstandes in Wasser, Entfärbung der Lösung und darauffolgender Polarisation.

Nach Bergell ²⁾ neutralisiert man 100—300 ccm Harn — bei hohem Zuckergehalt nach Vergärung mit Bierhefe — mit Natriumkarbonat, dampft auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz ein, versetzt den Sirup unter Kühlung bis zur deutlich sauren Reaktion mit sirupdicker Phosphorsäure, verreibt die Masse mit 20—30 g feingepulvertem, geglühtem Kupfersulfat und 25—50 g sehr feinem geglühtem Seesand bis zur Bildung eines trocknen Pulvers. Das so

¹⁾ S. Shindo, Über die quantitative Bestimmung der β -Oxybuttersäure im Harn. Dissertation, München 1907.

²⁾ P. Bergell, Zur Bestimmung der Oxybuttersäure im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie 33, 310 (1901).

erhaltene Pulver wird im Soxhletapparat mit absolutem Äther vollständig erschöpft, der Äther verjagt, der Rückstand in Wasser gelöst, mit Tierkohle behandelt und polarisiert.

Die Bestimmung nach Magnus-Levy¹⁾ erfolgt, indem man den frischen Harn mit 30—40 g Ammoniumsulfat und 10—15 ccm einer 20prozentigen Schwefelsäure auf je 100 ccm Harn versetzt und der Ätherextraktion unterwirft. Alle 24 Stunden gießt man den Äther aus dem Extraktionskölbchen durch ein trocknes Filter, jedesmal in eine neue Porzellanschale und überläßt der Verdunstung bei Zimmertemperatur. Die Extraktion ist beendet, wenn der Äther nur noch einen ganz geringen Rückstand hinterläßt, dessen wässrige Lösung keine wesentliche Linksdrehung mehr zeigt, was gewöhnlich nach der zweiten oder dritten Extraktion, d. h. nach 48 oder 72 Stunden, der Fall ist. Der Ätherrückstand besteht aus einem Sirup, der meistens Kristalle von Hippursäure enthält. Er wird in 8—16 ccm Wasser aufgenommen, wodurch eine Trübung oder ölige Ausscheidung entsteht, die sich in 12—24 Stunden zum Teil kristallinisch absetzt. Davon wird in einen kleinen Meßzylinder abgegossen, mit möglichst wenig Wasser quantitativ nachgespült und auf 10 oder 20 ccm genau aufgefüllt. Zur Klärung setzt man eine kleine Messerspitze Kieselgur zu und filtriert durch ein dichtes Filter; dieses Filtrat wird zur Polarisation angewandt.

Bei der Untersuchung des β -Oxybuttersäureextraktes im Traubenzuckerapparat muß man den abgelesenen Wert mit dem Faktor 2,18 multiplizieren, um auf Prozente β -Oxybuttersäure umzurechnen, da die spezifische Drehung der β -Oxybuttersäure 2,12 mal geringer ist als die des Traubenzuckers.

c) Bestimmung durch Oxydation nach Schaffer²⁾.

Man bringt 25—500 ccm Harn, je nach dem zu erwartenden größeren oder geringeren Gehalt an β -Oxybuttersäure, in einen 500 ccm fassenden Meßkolben, versetzt mit einem Überschuß von Bleiessig und 10 ccm konzentriertem Ammoniak, füllt mit Wasser bis zur Marke auf, schüttelt gut um und filtriert. 200 ccm des Filtrates verdünnt man auf 500 ccm und destilliert nach Zusatz von 15 ccm konzentrierter Schwefelsäure und etwas Talkum (zur Vermeidung des Siedeverzugs und Stoßens), unter Ersatz des verdampfenden Wassers, bis 200—250 ccm Flüssigkeit in die Vorlage übergegangen sind — Destillat A, das das präformierte und das aus Azetessigsäure gebildete Azeton nebst flüchtigen Fettsäuren enthält. Der Destillationsrückstand wird einer zweiten Destillation unter Zutropfen von 400 bis 600 ccm einer 0,1—0,5prozentigen Kaliumbichromatlösung unterworfen, bis 500 ccm übergegangen sind, die man dann mit 20 ccm einer

¹⁾ A. Magnus-Levy, Die Azetonkörper. Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde **1**, 416 (1908).

²⁾ Ph. Schaffer, A method for the quantitative Determination of β -Oxybutyric acid in the urine. Journ. of Biol. Chemistry **5**, 211 (1908/09).

3prozentigen Wasserstoffsuperoxydlösung und etwas Natronlauge nochmals destilliert, bis 300 ccm Flüssigkeit übergegangen sind. In diesem Destillat wird das Azeton in üblicher Weise mit Jod- und Thiosulfatlösung titriert.

34. Fett.

Das Fett findet man im Harn in verschiedener Form, so z. B. 1. in Form von Fettaugen oder Talgpartikelchen, die an der Oberfläche schwimmen, 2. als eine milchähnliche Emulsion (bei Chylurie), 3. in Form von Fettkongrementen und Kristallnadeln.

Das Fett erkennt man leicht unter dem Mikroskop.

Die Isolierung sowie quantitative Bestimmung des Fettes im Harne geschieht durch Ausschütteln im Scheidetrichter oder durch Extraktion bis zur Erschöpfung in besonders konstruierten Apparaten mit Äther, Ligroin, Benzol, Chloroform und anderen organischen Lösungsmitteln. Das Lösungsmittel wird abdestilliert, der Rückstand mit verdünnter Sodalösung, verdünnter Schwefelsäure und zuletzt mit Wasser behandelt, um die beigemengten sauren, basischen und neutralen Stoffe zu entfernen. Den auf diese Weise gereinigten Rückstand trocknet man 2—3 Stunden bei 100° C im Trockenschrank, löst ihn wieder in absolutem Äther oder bei 50—60° siedendem Petroleumäther auf, verjagt den Äther, trocknet den Extrakt bei 100° C und wägt. Zweckmäßiger ist es, wenn man den Harn mit sorgfältig ausgewaschenem, geglühtem Seesand unter öfterem Umrühren bis zur Trockne eindampft, den Rückstand im Mörser zerreibt und das so erhaltene Pulver im Soxhletapparat mit Äther oder Chloroform erschöpfend extrahiert und weiter wie oben angegeben verfährt.

P. Kot.

1. Sammlung und Vorbereitung des Kotes.

Um den zu einem Stoffwechselversuch gehörenden Kot möglichst quantitativ zu gewinnen, verfährt man in folgender Weise. Man verabfolgt dem Versuchstier nach Voits Vorschlag mindestens 18 Stunden vor dem Beginn und nach Abschluß des Versuchs etwa 60 g weiche Knochen, dann kann man den weißen, krümeligen Knochenkot von dem sonst dunklen Fleischkot mit Leichtigkeit trennen.

Salkowski und Munk grenzten den Kot ab, indem sie dem Versuchstiere am Abend vor und am Abend des letzten Versuchstages vier kleine Korkstückchen gaben. Cremer und Neumeier empfehlen, die Abgrenzung des Kotes mit der auf nassem Wege erzeugten Kieselsäure, die man (für größere Hunde 25—120 g) mit einer entsprechenden Menge Fleisch oder Fett vermischt, durchzuführen. Dieser Kot sieht genau so aus wie der Knochenkot, hat aber nicht die Nachteile des letzteren, die besonders im Stickstoffgehalt der Knochen bestehen. Da im Magen und Blinddarm der Pflanzenfresser eine Vermischung

von älterem und neuerm Speisebrei stattfindet, empfiehlt Voit, die Wiederkäuer und Einhufer mit einem bestimmten Nahrungsmittel 5 bis 10 Tage zu füttern, bis sicher ausschließlich auf sie treffender Kot erscheint.

Ranse verabreicht beim Menschen am Tage vor dem Versuche Preiselbeeren, deren rote Farbe den betreffenden Kot kennzeichnet. Weiske grenzte den Kot vegetabilischer zellulosehaltiger Nahrung mit rein animalischer zellulosefreier Nahrung ab. Rubner trennt den Kot mit Milch, die einen ganz charakteristischen, hellgelben festen Kot liefert. Die Abgrenzung geschieht auch mittels Tierkohle und Karmin in Oblaten, die man mit der letzten oder ersten Nahrungsportion verabreicht. Bei Tierkohle empfiehlt es sich, drei Löffel von einer Mischung von 15 g Kohle, 15 g Gummiarabikum und Pfefferminzwasser 60,0 g zu geben, wobei die Kohle in einem Mörser mit feinstem Gummiarabikumpulver unter Zusatz von geringen Mengen des Pfefferminzwassers bis zur Bildung einer homogenen sirupartigen Masse verrieben wird.

Bei allen Stoffwechseluntersuchungen wird der Kot, den das Versuchstier oder der Mensch innerhalb 24 Stunden ausgeschieden hat, sorgfältig gesammelt, unter Anwendung eines Konservierungsmittels, wie Chloroform, Toluol usw., in gut schließenden Glasgefäßen aufbewahrt. Der von dem ganzen Versuch gesammelte Kot wird durchgemischt, in ein möglichst weites Gefäß gebracht und in dünner Schicht ausgebreitet und im Vakuum bei 50° C eingedampft. Zuntz konstruierte speziell für diese Zwecke einen Vakuumapparat von etwa 1 m Länge und 50 cm im Durchmesser, der mittels einer in Öl rotierenden Saugluftpumpe evakuiert und mit Dampf erhitzt wird, wobei die Temperatur sich sehr leicht regulieren läßt. Das Kondenswasser wird in einem besonders dazu eingerichteten Behälter gesammelt. Bei geringen Kotmengen bedient man sich eines gewöhnlichen Exsikkators. Ist der Kot dickbreiig, so kann man zugleich mit dem Evakuieren die Temperatur auf 50° C bringen; bei stark wasserhaltigem Kot empfiehlt es sich jedoch, zuerst bei gewöhnlicher Temperatur zu evakuieren und erst am nächsten Tage mit dem Erhitzen vorsichtig zu beginnen, um ein zu Verlusten führendes Schäumen zu vermeiden. Nachdem der Kot eingetrocknet ist, wird er zusammen mit dem Gefäß nach einigem Stehen an der Luft, um lufttrocken zu werden, gewogen. Die Differenz zwischen beiden Werten ergibt die Menge des luftgetrockneten Kotes. Dieser wird nun in einem Mörser oder mittels einer Kaffeemühle fein zerrieben, wobei man die eventuell beigemengten Haare mittels eines Siebes trennt und in diesem Zustande zur Analyse verwendet.

Poda versetzt die Tagesmenge mit etwas Schwefelsäure (wenn eine Schwefelsäurebestimmung beabsichtigt wird, mit Salzsäure, Phosphorsäure, auch Oxalsäure) und dampft in einer tartierten Porzellanschale auf dem Wasserbade unter öfterem Umrühren bis zur Bildung eines dicken Sirups ein. Den Sirup behandelt man mehrmals mit

50 ccm Alkohol auf dem Wasserbade, bis die Masse nach dem Erkalten pulverisierbar geworden ist, und wägt wieder.

Trockensubstanz.

Zur Bestimmung der Trockensubstanz bringt man vom frischen sorgfältig durchgemischten Kot etwa 10 g, vom lufttrockenen 3—5 g in ein tariertes Wägegläschen und trocknet bei 100° C bis zur Gewichtskonstanz. Die so erhaltene Menge Trockensubstanz des lufttrockenen Kotes muß auf die ursprüngliche Menge des frischen Kotes berechnet werden.

2. Stickstoff und Stickstoffsubstanz.

Die Stickstoffbestimmung geschieht nach dem Kjeldahlverfahren, indem man vom frischen, sorgfältig in einem Mörser zerriebenen Kot etwa 6—8 g, vom lufttrockenen 1—2 g verwendet und mindestens 2—3 Kontrollbestimmungen macht.

Da der Kot stickstoffhaltige Gallenbestandteile enthält, die bei der Berechnung der Verdauungskoeffizienten für die stickstoffhaltigen Stoffwechselerzeugnisse einen Fehler verursachen, indem letztere in Wirklichkeit höher sind, als sie sich aus Futter minus Kotbestandteilen berechnen. Um diesen Fehler zu beseitigen, zieht man den lufttrocknen Kot mit Äther, Alkohol und Wasser aus, bestimmt in diesen Auszügen den Stickstoff und zieht die Stickstoffmenge von der gesamten Stickstoffmenge im Kote ab und bekommt so einen richtigen Wert für den unverdauten Stickstoff der Nahrung. Berücksichtigt muß noch werden, daß der Ätherauszug und zum Teil der Alkoholauszug stickstoffhaltiges Chlorophyll und der Wasserauszug außer Taurin noch andere Stickstoffverbindungen löst, andererseits aber die in Form von Darmepithelien und Schleimstoffen mit ausgeschiedenen Stickstoffverbindungen durch diese Lösungsmittel nicht gelöst werden. Den Tauringehalt bestimmen Schulze und Märcker, indem sie den Schwefelgehalt des wässerigen Auszuges ermitteln und die Menge Taurin daraus berechnen. Taurin enthält 25,60 Proz. Schwefel und 11,2 Proz. Stickstoff.

3. Reinprotein.

Zur Bestimmung des Reinproteins wendet Zaitschek die von Stutzer angegebene Kupferhydroxymethode für den Kot in folgender Weise an. Man übergießt 2 g Kot in einem Becherglase mit 50 ccm Wasser, kocht auf und versetzt mit 25 ccm einer 6prozentigen Kupfersulfatlösung und 25 ccm einer 1,25prozentigen Natronlauge. Der entstandene Niederschlag wird auf ein Filter gebracht, mit Wasser kupfersulfatfrei gewaschen und darin der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Der gefundene Stickstoffgehalt, mit 6,25 multipliziert, gibt die Menge Eiweiß (Reinprotein) und die Differenz zwischen Rohprotein und Reinprotein die Menge des „Nichteiweißes“.

Um in einem verhältnismäßig trockenen Kote von Schaf, Ziege,

Kaninchen die Menge des in Form von Stoffwechselprodukten vorhandenen Stickstoffs zu ermitteln, empfiehlt A. Stutzer¹⁾, den Kot, sofern er nicht frisch untersucht werden kann, durch Zusatz von Schwefelkohlenstoff in dem Verhältnisse zu konservieren, daß auf je 100 g des Kotes 1 cem Schwefelkohlenstoff angewendet wird. Der Kot wird in luftdicht schließenden Gefäßen aufbewahrt.

Die Ausführung der Bestimmung geschieht in der Weise, daß man so viel, als ungefähr 2 g Trockenkot entspricht, mit 250 cem Magensaft (siehe S. 17) übergießt, auf 37° C erwärmt und allmählich so viel Salzsäure hinzufügt, daß schließlich 1 Proz. Salzsäure vorhanden ist. Nach 12 Stunden wird filtriert und der Stickstoff im Filtrerrückstand bestimmt. Außerdem ermittle man die Gesamtmenge Stickstoff im Kot. Die Differenz der beiden Werte ergibt den in den Stoffwechselendprodukten vorhandenen Stickstoff.

4. Proteinstoffe.

Nachweis. Die zu untersuchenden Fäzes werden mit mehrfachen Volumen Wasser verrieben, mit Essigsäure bis zur sauren Reaktion versetzt und filtriert, der Rückstand mit stark verdünnter Natronlauge verrieben und abermals filtriert. Das erste Filtrat untersucht man auf Eiweiß und Albumosen (s. S. 17), im zweiten werden phosphorhaltige Proteide und Glykoproteide in folgender Weise nachgewiesen.

Muzine (Mukoide), phosphorhaltige Proteide. 100 cem des Filtrates 2 versetzt man mit Essigsäure, filtriert, wäscht den Niederschlag mit essigsäurehaltigem Wasser aus, löst ihn in Wasser unter Zusatz von Kalilauge bis zur schwach alkalischen Reaktion, fällt wieder mit Essigsäure und untersucht den abfiltrierten Niederschlag in folgender Weise:

Man kocht einen Teil des Niederschlages mit verdünnter Mineralsäure und prüft die Flüssigkeit wie auf S. 347 angegeben.

Ein anderer Teil des Niederschlages wird mit Alkohol und Äther extrahiert und der Extrakt auf organisch gebundenen Phosphor (siehe S. 159) geprüft. Ist organisch gebundener Phosphor vorhanden, so löst man einen anderen Teil des Niederschlages in Natronlauge, versetzt mit Salzsäure, kocht, bis die Lösung klar geworden ist, übersättigt sie mit Ammoniak und fügt Silbernitratlösung hinzu, wobei ein flockiger Niederschlag die Gegenwart von Nukleoproteid zeigt. Ist organisch gebundener Phosphor nicht vorhanden, so liegt Paranukleoproteid vor.

Versetzt man einen aliquoten Teil des Filtrates 2 mit Alkohol, so erhält man in Gegenwart von Pseudomuzin einen Niederschlag.

Man erhitzt einen Teil des Filtrates 2 zum Sieden, versetzt vorsichtig mit stark verdünnter Essigsäure, bis das Eiweiß sich vollständig ausgeschieden hat, filtriert, wäscht den Niederschlag gut aus, neutralisiert genau das Filtrat und Waschwasser, dampft auf dem Wasser-

¹⁾ A. Stutzer, E. Merres und L. Seidler, Die Untersuchung des Kotes auf den Gehalt an Stickstoff, der in Form von Stoffwechselprodukten darin enthalten ist. Biochem. Zeitschr. 9, 310 (1908).

bade ein und fällt mit Alkohol. Den Niederschlag löst man in Wasser und dialysiert ihn zur Entfernung der Salze. Das so erhaltene Filtrat wird mit Essigsäure gefällt, der Niederschlag mit Mineralsäure gekocht, wobei in Gegenwart von Mukoiden eine reduzierende Substanz erhalten wird.

5. Ammoniak.

Nachweis. Die frischen Fäzes werden mit Wasser verrieben, das Gemisch in einen Erlenmeyerkolben gebracht, mit der gleichen Menge einer Aufschwemmung von *Magnesia usta* in Wasser versetzt und gerührt. Der Kolben wird mit einem Pfropfen geschlossen, an dessen Ende ein angefeuchtetes rotes Lackmuspapier befestigt ist. Die Gegenwart von Ammoniak läßt sich an der Blaufärbung des Lackmuspapiers erkennen.

Quantitative Bestimmung. Das Ammoniak bestimmt man durch Destillation des Kotes mit *Magnesia usta* im Vakuum bei 43° C, höhere Temperaturen sind zu vermeiden, da leicht zersetzliche stickstoffhaltige Verbindungen beim Kochen mit *Magnesia usta* bei 100° Ammoniak abspalten, und man also auf solche Weise zu hohe Werte erhält.

Ein genaues Verfahren zur Bestimmung des Ammoniaks haben Krüger und Schittenhelm angegeben. Man verreibt die abgewogene Menge Kot mit ½prozentiger Salzsäure und verfährt, wie beim Harn angegeben ist (S. 329).

6. Trimethylamin.

Der Kot wird mit 2prozentiger Schwefelsäure verrieben, auf dem Wasserbade unter Umrühren bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand pulverisiert, mit warmem Wasser ausgezogen, die Auszüge nach dem Erkalten filtriert und das Filtrat zur Bestimmung des Trimethylamins in der S. 357 angegebenen Weise weiter behandelt.

7. Diamine.

Man digeriert den zu untersuchenden Kot 24 Stunden mit schwefelsäurehaltigem Alkohol, filtriert, wäscht den Niederschlag mit schwefelsäurehaltigem Alkohol nach, dampft den alkoholischen Auszug auf dem Wasserbade ein, löst den Rückstand in Wasser und benzoyliert nach dem S. 357 angegebenen Verfahren. Die im Niederschlage enthaltene Benzoylverbindung wird in Alkohol gelöst, mit Wasser gefällt und aus Alkohol umkristallisiert.

8. Purinbasen.

Bestimmung der Purinbasen. Der Kot wird zunächst durch Kochen mit verdünnter Schwefelsäure aufgeschlossen, indem man ihn je nach der Menge mit 1—2 Liter Wasser, das mit 10—20 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt wird, mehrere Stunden über freier Flamme erhitzt. Die schwefelsaure Lösung wird mit Natronlauge deutlich alkalisch gemacht, dann mit 10—20 ccm Eisessig angesäuert und nach Zusatz von 5—10 g Oxalsäure zur Ausfällung des Kalkes kurze Zeit auf dem Wasserbade erwärmt. Nach dem Erkalten füllt man die Flüssigkeit auf 1500—3000 ccm auf, filtriert durch ein trockenes Faltenfilter und verwendet einen aliquoten gemessenen Teil zur Basenbestimmung. Bei

reichlichem Niederschlag empfiehlt es sich, ihn mit heißem Wasser vom Filter zu spritzen und noch einmal mit Natriumazetat und essigsäurehaltigem Wasser zu digerieren. Von den vereinigten nicht konzentrierten essigsauren Filtraten versetzt man 500 ccm in einem Rundkolben mit Natronlauge bis zur schwach alkalischen Reaktion, fügt pro 100 ccm je 10 ccm käufliche 40prozentige Natriumbisulfidlösung hinzu und erhitzt zum Sieden. Hierauf versetzt man die heiße Flüssigkeit pro 100 ccm mit je 10prozentiger Kupfersulfatlösung, erhält im Sieden 3 Minuten, filtriert den Niederschlag sofort durch ein Faltenfilter ab, wäscht ihn mit heißem Wasser nach und spritzt ihn möglichst bald mit heißem Wasser in den Fällungskolben zurück, um ein Antrocknen des Niederschlages auf dem Filter zu vermeiden. Man kann auch zweckmäßig den Niederschlag mit dem Filter in den Kolben zurückbringen, mit Wasser kräftig durchschütteln, bis sich der Kupferniederschlag fein verteilt, damit der Schwefelwasserstoff resp. das Natriumsulfid um so besser einwirken können. In jedem Falle wird die den Niederschlag enthaltende Flüssigkeit zum Sieden erhitzt, mit so viel einer aus 1prozentiger Natronlauge hergestellten Natriumsulfidlösung versetzt, bis Bleiazetpapier deutlich braun gefärbt wird, und einige Minuten im Sieden erhalten. Hierauf säuert man mit 10prozentiger Essigsäure an, läßt weiter kochen, bis sich das Kupfersulfid leicht in Flocken zusammenballt und die überstehende Flüssigkeit klar ist, saugt das Kupfersulfid ab, wäscht es mit heißem Wasser aus, dampft das Filtrat unter Zusatz von 10 ccm einer 10prozentigen Salzsäure bis zur Trockne ein und bringt den Rückstand durch Digerieren mit 5 ccm Salzsäure und etwas Wasser auf dem Wasserbade in Lösung.

Nach dem Erkalten filtriert man von dem geringen, aus Schwefel und braunen, humusartigen Flocken bestehenden Rückstand ab und wäscht ihn mehrmals mit Wasser aus. In dem etwa 80 ccm betragendem Filtrate werden die Basen am besten mit Hilfe der Kupferfällung in derselben Weise wie beim Harn bestimmt, nur daß hier bei Abwesenheit von Harnsäure die Oxydation derselben mit Braunstein in essigsaurer Lösung wegfällt. Das Filtrat erhitzt man zum Sieden, macht mit Ammoniak schwach alkalisch und säuert mit 10 ccm Natriumbisulfidlösung an. Dann fügt man 5—10 ccm einer 10prozentigen Kupfersulfatlösung hinzu, erhält die Flüssigkeit noch 3 Minuten im Kochen, filtriert durch ein schwedisches Faltenfilter, wäscht den Niederschlag mit heißem Wasser aus, bestimmt den Stickstoffgehalt nach Kjeldahl.

Darstellung und Identifizierung der Purinbasen. Zur Darstellung der Purinbasen benötigt man eine größere Menge Kot von mehreren Wochen. Es empfiehlt sich, den Kot jeden Tag ganz frisch sofort zu verarbeiten, damit keine die Basen zerstörende Fäulnis eintritt, oder auch vom lufttrocknen Kot auszugehen, indem man die Tagesmenge sofort trocknet und pulverisiert, in gut schließenden Gefäßen aufbewahrt und dann vereint mit den anderen Portionen verarbeitet. Der frische Kot läßt sich auch in gut geschlossenen Gefäßen in Chloroform oder einem anderen Konservierungsmittel aufbewahren, ohne daß er eine Veränderung erleidet.

Die Tagesmenge wird nach Krüger und Schittenhelm¹⁾ mit 2 Liter Wasser und 15 ccm konzentrierter Schwefelsäure 2—3 Stunden über freier Flamme gekocht, dann mit Natronlauge alkalisch und mit Essigsäure wieder sauer gemacht, erhitzt und filtriert. Die Basen werden aus dem Filtrat wie bei der quantitativen Bestimmung mit Kupfersulfat und Bisulfid ausgeschieden. Die Kupferoxydulniederschläge suspendiert man in heißem Wasser, zersetzt sie mit Schwefelwasserstoff, fügt etwas Schwefelsäure hinzu, um das etwa ausgeschiedene Guanin zu lösen, und filtriert vom Kupfersulfid ab. Ist das Filtrat noch stark gefärbt, so erhitzt man es so lange mit basischem Bleiazetat, bis die Flüssigkeit hellgelb geworden ist. Das Filtrat macht man mit Natronlauge alkalisch, versetzt es mit 100 ccm Natriumbisulfidlösung und filtriert den ausgeschiedenen Niederschlag ab. Die Basen werden aus der Lösung durch Kupfersulfat nochmals ausgefällt.

Die nur noch wenig gefärbte Lösung der auf diese Weise erhaltenen Basen wird auf etwa 150 ccm eingedampft, mit 30 ccm 10prozentigen Ammoniaks in der Wärme gefällt, das dabei ausgeschiedene Guanin nach 24stündigem Stehen abfiltriert, noch einmal mit 2prozentigem Ammoniak in der Wärme digeriert, nach 24 Stunden abfiltriert, in Natronlauge gelöst und durch Ansäuern

¹⁾ M. Krüger und A. Schittenhelm, Die Purinbasen der Fäzes. Zeitschrift f. physiol. Chemie 35, 153 (1902).

der alkalischen Lösung mit Essigsäure wieder gefällt. Die Hauptmenge des so ausgeschiedenen Guanins wird in das in langen Prismen kristallisierende Sulfat, $C_5H_5N_5 \cdot O \cdot H_2SO_4 + 2 H_2O$, übergeführt und durch Analyse identifiziert.

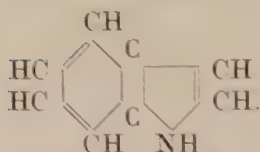
Die ammoniakalischen Filtrate vom Guanin werden nach dem Verjagen des Ammoniaks mit Salzsäure zur Trockne eingedampft, der Rückstand zur Entfernung der überschüssigen Salzsäure noch einmal mit Wasser, dann mehrmals mit Alkohol eingedampft. Die Lösung der salzsauren Salze wird mit Wasser auf etwa 150 ccm gebracht, mit einer gesättigten Lösung von Natriumpikrat so lange versetzt, als noch ein weiterer Zusatz zu einer Probe des Filtrates sofort eine Trübung hervorruft. Das so ausgeschiedene abfiltrierte pikrinsaure Adenin, $C_5H_5N_5 \cdot C_6H_2(NO_2)_3 \cdot OH$, ist noch nicht rein, da das Natriumpikrat auch die Farbstoffe mitfällt. Zur Bestimmung des Adeningehaltes empfiehlt es sich, in einer genau abgewogenen Menge der lufttrockenen Substanz den Basengehalt mit Hilfe der Kupferoxydulfällung zu ermitteln und den Stickstoff auf Adenin umzurechnen. Zur Reinigung löst man das Adeninpikrat in heißem Wasser unter Zusatz der berechneten Menge Normalnatronlauge und der der Lauge entsprechenden Normalsalzsäure und erhitzt mit Tierkohle. Das Filtrat scheidet beim Erkalten das Adeninpikrat in langen glänzenden Nadeln ab. Da von den natürlich vorkommenden Purinbasen nur Guanin, Adenin, Hypoxanthin und Epiguanin Pikrate bilden, die sich schon durch die Kristallform voneinander unterscheiden, von denen außerdem die des Adenins und Epiguanins bei bestimmten Temperaturen liegende Zersetzungspunkte haben, so genügt zur Identifizierung des Adeninpikrats die Ermittlung des Zersetzungspunktes, der bei $281^\circ C$ liegt. Mischt man dieses Produkt mit reinem Adenin anderer Herkunft, so darf sich der Schmelzpunkt nicht verändern.

Versetzt man das Filtrat vom Adeninpikrat mit Kupfersulfat und Natriumbisulfid, kocht den ausgeschiedenen Niederschlag mehrmals aus und zersetzt ihn mit Schwefelwasserstoff, so erhält man ein Basengemenge, das aus Xanthin und Hypoxanthin besteht. Das Gemenge wird mit Tierkohle entfärbt, dann mit Salzsäure eingedampft, der Überschuß der Säure in der oben angegebenen Weise entfernt, der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen; es geht neben den salzsauren Salzen freies Xanthin in die wässrige Lösung über, die nach längerem Stehen im Eisschrank Xanthin ausscheidet. Das Filtrat liefert nach dem Eindampfen einen Rückstand, der der Hauptsache nach aus salzsaurem Hypoxanthin nebst Spuren des in Lösung gebliebenen Xanthins besteht.

Das Xanthin löst man durch Erwärmen in einem kleinen Überschuß von Normalnatronlauge, verdünnt mit etwas Wasser und filtriert die auf 60° erwärmte Lösung langsam in ein vorher aufgekochtes kaltes Gemisch von 20 ccm konzentrierter Salpetersäure und ebensoviel Wasser, wobei sich salpetersaures Xanthin als schweres Kristallpulver in Form von aus feinen Blättchen bestehenden Drusen ausscheidet. Beim Eindampfen der ammoniakalischen Lösung des Xanthinnitrats scheidet sich das Xanthin als schuppige Haut aus, das man auf dem Filter mit Alkohol und Äther auswäscht und bei 100° trocknet. Ist die Ausbeute an Xanthin sehr gering, so löst man es in Ammoniak, fügt ammoniakalische Silberlösung hinzu und erhält einen gallertigen Niederschlag von $C_5H_4N_4O_2 \cdot Ag_2O$, der in Salpetersäure gelöst, salpetersaures Xanthinsilberoxyd, $C_5H_4N_4O_2AgNO_3$, gibt, das sich bei Verdünnung langsam in charakteristischen kugligen Aggregaten kleiner Nadeln abscheidet.

Zur Reinigung des Hypoxanthins führt man dieses in das pikrinsaure Salz in der Weise über, daß man das salzsaure Salz mit einem kleinen Überschuß Pikrinsäure in etwa 50 ccm heißem Wasser löst, wobei sich die Lösung in Gegenwart von Adenin gleichmäßig trübt. Die Trübung ballt sich beim Schütteln der Flüssigkeit leicht in Flocken zusammen, die man sofort abfiltriert, und das Filtrat scheidet nach dem Eindampfen und Erkalten das Hypoxanthinpikrat $C_5H_4N_4O \cdot C_6H_2(NO_2)_3 \cdot OH$ in makroskopischen tafelförmigen Kristallen, die mit keinem Pikrat der Purinbasen zu verwechseln sind. Zur Überführung in das salpetersaure Salz wird das Pikrat in Wasser unter Zusatz von Salpetersäure gelöst und die Pikrinsäure durch Schütteln mit Benzol oder Toluol entfernt. Beim Konzentrieren der salpetersauren Lösung scheidet sich das Nitrat $C_5H_4N_4O \cdot HNO_3 + H_2O$ in wetzsteinförmigen Kristallen aus.

9. Indol C_8H_7N



Eigenschaften. Das Indol kristallisiert in Blättchen, die bei $52^\circ C$ schmelzen und bei $253\text{--}254^\circ C$ unter Zersetzung sieden. Es löst sich in Wasser, Alkohol, Äther, Chloroform, Ligroin.

Nachweis. Taucht man einen mit Salzsäure befeuchteten Fichtenspan in eine alkoholische Indollösung, so färbt er sich kirschrot.

Legalsche Probe. Versetzt man eine Indollösung mit frisch hergestellter Nitroprussidnatriumlösung bis zur Gelbfärbung und einigen Tropfen Natronlauge, so entsteht eine violettblaue Färbung, die auf Zusatz von Salzsäure oder Essigsäure bis zur sauren Reaktion blau wird. Empfindlichkeit 1:500 000 (Salkowski).

Blumenthals Probe¹⁾. Wird eine stark verdünnte, salpetrigsaures Salz enthaltende Lösung von Indol mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt, so färbt sie sich purpurrot.

Reaktion von Konto²⁾. Beim Versetzen einer Indollösung mit 4prozentiger Formaldehydlösung und konzentrierter Schwefelsäure tritt violettrote Farbe auf.

Reaktion von P. Ehrlich und Steensma³⁾. Fügt man zu einer Indollösung das halbe Volumen einer 2prozentigen p-Dimethylaminobenzaldehydlösung und tropfenweise 25prozentige Salzsäure hinzu, so färbt sie sich rot und wird auf Zusatz von einigen Tropfen einer 0,5prozentigen Natriumnitritlösung dunkler rot gefärbt.

Nach Hopkins und Dakin⁴⁾ rufen Glyoxylsäurelösung und konzentrierte Schwefelsäure Rotfärbung hervor.

Isolierung. Um das Indol nachzuweisen, muß man es aus dem Kot isolieren. Dies geschieht in der Weise, daß man den Kot mit Wasser zu einem dünnen Brei verreibt und destilliert, bis ein Drittel des Volumens übergegangen ist. Dieses Destillat, das flüchtige Säuren, Phenol, Skatol und Indol enthält, wird mit Salzsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Der Ätherauszug wird durch Schütteln mit Natronlauge von den flüchtigen Säuren und dem Phenol befreit, der Äther verdunstet, der Rückstand mit Natronlauge versetzt und im Dampfstrom destilliert, wobei Indol und Skatol übergehen. Indol und Skatol lassen sich auch isolieren, indem man die mit dem mehrfachen Volumen Wasser und mit wenig 10prozentiger Natronlauge verriebenen Fäzes im Dampfstrom destilliert und das Destillat mittels der angegebenen Reaktionen prüft.

Quantitative Bestimmung. Die von Herter und Joster angegebene Methode zur Bestimmung von Indol beruht auf der Eigenschaft des Indols, sich in alkalischer Lösung mit Naphthochinon-

¹⁾ F. Blumenthal, Beiträge zum Nachweis und zur Entstehung aromatischer Körper im Organismus. Biochemische Zeitschrift **19**, 521 (1909).

²⁾ Konto, Über eine neue Reaktion auf Indol. Zeitschr. f. physiol. Chemie **48**, 185 (1906).

³⁾ P. Ehrlich, Medizinische Woche **1901**. — J. A. Steensma, Über Farbenreaktionen der Eiweißkörper des Indols und des Skatols mit aromatischen Aldehyden und Nitrilen. Zeitschr. f. physiol. Chemie **47**, 25 (1906).

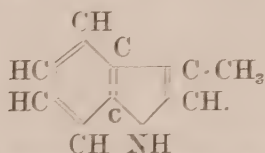
⁴⁾ Dakin, The glyoxylic acid reaction. Journ. biolog. Chem. **2**, 289 (1906).

natriummonosulfonat unter Bildung eines blauen kristallinen Körpers zu verbinden, der in Wasser wenig löslich ist, mit Chloroform aber mit Leichtigkeit einer wässrigen Lösung entzogen werden kann.

Man verreibt 30—50 g Kot mit der 10—20fachen Menge Wasser und 2—3 cem Natronlauge und destilliert im Dampfstrom, bis etwa die Hälfte übergegangen ist. Das Destillat wird mit Natronlauge alkalisch gemacht und mit einer 2prozentigen Lösung von β -Naphthochinonnatriummonosulfonat in geringem Überschuß versetzt, wobei sich nach einigen Minuten die Verbindung des Indols ausscheidet, die man dann abfiltriert und wägt. Säuert man das Filtrat an und destilliert, so geht Skatol über.

Die von Moraczewsky vorgeschlagene Methode gibt nur annähernde Werte. Sie besteht darin, daß man 30—40 g Kot mit 700 cem Wasser verreibt und in einem 1500 cem fassenden Kolben bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion unter guter Kühlung destilliert, bis 500 cem übergegangen sind. Von diesem Destillat versetzt man 150 cem mit 10 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure und 1 g Kieselgur, schüttelt gut durch, filtriert, versetzt 100 cem Filtrat mit 5—10 Tropfen einer 0,2prozentigen Natriumnitritlösung, läßt 2 Stunden stehen und vergleicht dann die Intensität der entstandenen Färbung mit der einer Testlösung. Diese besteht aus einer Lösung von 0,0002 g Indol in 100 cem Wasser, 10 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure und 5 Tropfen 0,2prozentiger Natriumnitritlösung und soll zu jedem Versuch aus einer Stammlösung von 0,9599 g Indol in 250 cem Alkohol frisch bereitet werden. Die Untersuchung der beiden gefärbten Flüssigkeiten geschieht in einem Kolorimeter. Da der Farbenton der beiden Flüssigkeiten ein verschiedener ist — der des Destillates ist rein rot, der der Testlösung rosa —, so ist nur eine annähernde Schätzung möglich. Um den Farbenton beider Flüssigkeiten auszugleichen, empfiehlt es sich, der Testlösung vorsichtig Tropäolin oder Bichromatlösung zuzusetzen. Bei sehr hohem Indolgehalt muß das Kotdestillat dementsprechend verdünnt werden, da sonst der rote Farbstoff sich in Substanz ausscheiden würde.

10. Skatol ¹⁾ C_9H_9N



Eigenschaften. Das Skatol (β -3-Methylindol) stellt farblose Blättchen dar von stechendem Geruch, die bei 95° C schmelzen und bei 265—266° C sieden. Es löst sich in Wasser schwerer als Indol, ist leicht löslich in Alkohol, Äther, Chloroform, Benzol; ist mit Wasserdämpfen leicht flüchtig. Das Skatolpikrat destilliert im Gegensatz zu Indolpikrat unzersetzt beim Erhitzen mit verdünnter wässriger Natronlauge.

Nachweis. Blumenthals Reagens ruft in einer wässrigen Skatollösung eine weißliche Trübung hervor.

Legalsche Probe. Nitroprussidnatrium und Natronlauge geben in Skatollösungen eine intensiv gelbe Färbung, die beim Erhitzen zum Kochen mit dem halben Volumen Eisessig in Violett übergeht (Salkowski).

Reaktion von Konto. Eine Skatollösung liefert beim Versetzen mit Formaldehyd und konzentrierter Schwefelsäure eine Gelb- oder Braunfärbung.

¹⁾ Über Farbenreaktionen der Eiweißkörper, des Indols und des Skatols mit aromatischen Aldehyden und Nitriten. Zeitschr. f. physiol. Chemie 47, 25 (1906). — Dakin, The glyoxylic acid reaction. Journ. biolog. Chem. 2, 289 (1906).

Unterschichtet man eine Mischung von 3 ccm sehr verdünnter Skatollösung und 3 Tropfen aldehydfreien Methylalkohol mit dem gleichen Volumen konzentrierter Schwefelsäure, die in 100 ccm einen Tropfen einer 1prozentigen wässerigen Ferrisulfatlösung enthält, so entsteht an der Grenze der beiden Schichten ein violettroter Ring. Schüttelt man nun die Flüssigkeit nach einigen Minuten, so färbt sie sich violettrot.

In konzentrierter Salzsäure löst sich das Skatol mit violetter Farbe. Die alkalische Lösung ist gelb und wird nach dem Ansäuern mit Essigsäure und Kochen violett. Beim Erwärmen mit Schwefelsäure gibt Skatol eine prachtvoll purpurrote Färbung.

Der Nachweis und Bestimmung geschieht in der unter Indol angegebenen Weise und wie folgt:

Man säuert die mit Wasser verriebenen Fäzes mit Essigsäure und destilliert, bis etwa die Hälfte übergegangen ist, versetzt das Destillat mit Alkali, um die etwa übergegangenen Phenole zu binden, und destilliert wieder. Aus dem neuen zweiten Destillate werden Indol und Skatol mit Pikrinsäure nach Zusatz von Salzsäure ausgefällt und dann mit Ammoniak destilliert. Das Destillat wird mit Äther wiederholt ausgeschüttelt, wobei Indol und Skatol in Lösung gehen, die vereinigten Ätherauszüge verdunstet, der Rückstand in absolutem Alkohol gelöst und mit 8—10 Volumen Wasser versetzt, wobei Skatol gefällt wird, während Indol in Lösung bleibt.

Rohfaser.

Beim Kot der Pflanzenfresser ist infolge der reichlichen Beimengung von harzigen Gallenstoffen eine Auskochung mit Alkohol oft nötig, bevor man ihn der Behandlung mit verdünnter Schwefelsäure und Kalilauge usw. unterwirft. Auch ist zu beachten, daß mikroskopische Untersuchungen für die Beurteilung der mit dem Kot im unverdauten, jedoch oft mehr oder weniger veränderten Zustande aus dem Körper entfernten Futterbestandteile von großem Werte sind. Zu diesem Zwecke empfiehlt es sich, eine Probe des zu untersuchenden Kotes in einem Beutel von feiner Leinwand unter kaltem Wasser längere Zeit zu kneten und zu drücken, bis das Wasser nicht mehr getrübt wird und aus dem Rückstand keine weiteren löslichen Stoffe in die Flüssigkeit übergehen. Der sich bei längerem Stehen der Flüssigkeit ausscheidende Bodensatz wird unter dem Mikroskop mit Jodtinktur auf etwa vorhandene Stärkekügelchen und außerdem auf unlösliche und schwerlösliche Salze und sandige Beimengungen usw. untersucht; die filtrierte Flüssigkeit wird auf Zucker, gummiartige Stoffe, Milchsäure usw. geprüft.

Die quantitative Bestimmung der Rohfaser wird nach den S. 58 angegebenen Methoden ausgeführt.

12. Zellulose.

Nachweis. Man verreibt den zu untersuchenden Kot mit etwas verdünnter Schwefelsäure (1 : 5), versetzt mit gleichen Teilen Alkohol und Äther,

filtriert, wäscht den Niederschlag mit angesäuertem Alkohol-Äthergemisch, kocht ihn mit Wasser aus und filtriert. Den Niederschlag bringt man in ein Becherglas, erwärmt ihn mit verdünnter Natronlauge, verdünnt mit Wasser, filtriert durch Asbest, wäscht den Niederschlag mit Wasser, trocknet und pulverisiert. Das so erhaltene Pulver wird mit wenig reiner Schwefelsäure verrieben, die Lösung in die 20fache Menge siedendes Wasser vorsichtig getropft, die Flüssigkeit unter Ersatz des verdampfenden Wassers $\frac{1}{2}$ Stunde gekocht und auf Zucker geprüft (Hoppe-Seyler).

Quantitative Bestimmung. Nach Simon und Lohrisch ¹⁾ versetzt man von dem lufttrocknen, fein zermahlenen und gut durchmischten Kote 2 g in einem 500 ccm fassenden Becherglase mit 100 ccm heißen Wassers, löst hierin 100 g Ätzkali auf und, nachdem das Schäumen und starke Erwärmen nachgelassen hat, erhitzt man auf dem Wasserbade 1 Stunde lang. Nach dem Erkalten fügt man zur Oxydation und Aufhellung des dunkel gefärbten Reaktionsproduktes 5 ccm Wasserstoffsuperoxyd hinzu, wobei eine lebhaft Reaktion eintritt. Hierauf fällt man mit dem halben Volumen 95prozentigen Alkohols, eventuell unter Zusatz von 10 ccm Eisessig, die in Lösung gegangenen Anteile der Zellulose aus, filtriert durch ein gehärtetes Filter, wäscht den Filterrückstand mit heißem Wasser aus, bringt ihn auf ein gewogenes Filter, wäscht nochmals gründlich mit heißem Wasser, heißer verdünnter Essigsäure, heißem Wasser, Alkohol und Äther aus. Filter und Rückstand werden getrocknet und gewogen, verascht und unter Abzug des Aschenwertes die aschefreie Zellulose ermittelt.

Methode von Scheunert und Lötsch ²⁾. Diese Methode stellt ein Mittelding zwischen der ursprünglichen Methode von Lange ³⁾ und der von Simon und Lohrisch dar.

Der gesamte Kot wird zunächst auf dem Wasserbade scharf getrocknet, dann im Mörser ohne Verlust zerstoßen, lufttrocken gemacht und als Trockenkot gewogen. Der Trockenkot wird dann gemahlen, wiederum an der Luft liegen gelassen und in diesem Zustande zur Analyse gebraucht, die in folgender Weise ausgeführt wird.

1—2 g fein gemahlener Kot wird in ein Becherglas gebracht, mit 100 ccm Wasser verrührt und portionsweise 100 g Kalihydrat in Stangen eingetragen. Sobald Lösung eingetreten ist, erhitzt man auf siedendem Wasserbade eine Stunde lang, filtriert durch ein gehärtetes Filter und wäscht den Niederschlag so lange, bis das Filtrat ungefärbt abläuft. Hierauf spritzt man den Niederschlag in das Becherglas zurück, filtriert durch ein getrocknetes und gewogenes, aschefreies Filter und wäscht den Niederschlag mit heißem Wasser so lange, bis das ablaufende Wasser nicht mehr alkalisch reagiert. Nun wäscht man mit 5prozentiger heißer Essigsäure dreimal, spült abermals mit heißem

¹⁾ O. Simon und H. Lohrisch, Eine neue Methode der quantitativen Zellulosebestimmung in Nahrungsmitteln und Fäzes. *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **42**, 55 (1904). — H. Lohrisch, Über die Bedeutung der Zellulose im Haushalte des Menschen. *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **47**, 200 (1906).

²⁾ A. Scheunert und E. Lötsch, Vermag der Hund Rohfaser oder Zellulose zu verdauen? *Biochem. Zeitschr.* **20**, 10 (1909).

³⁾ G. Lange, Zur quantitativen Bestimmung der Zellulose. *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **14**, 283 (1890).

Wasser bis zum Verschwinden der sauren Reaktion nach und wäscht mit Alkohol und Äther. Das Filter mit dem grauweißen Inhalt wird bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, gewogen, wodurch man die aschehaltige Zellulose bestimmt und nach dem Veraschen durch Wägung und Subtraktion die aschefreie Zellulose ermittelt.

13. Stärke.

Da das Muzin bei der hydrolytischen Spaltung ein reduzierendes Kohlehydrat liefert und auf solche Weise die Genauigkeit der Stärkebestimmung beeinträchtigen kann, so muß man vor dem Eintrocknen des Kotes die Schleimflocken möglichst mechanisch entfernen und die Fehlerquellen dadurch beseitigen.

Verfahren von Straßburger¹⁾. Dieses Verfahren stellt eine Kombination der Methoden von Liebermann und von Pflüger dar. Man erhitzt in einem Kolben 2—3 g fein gemahlenen, bei 100° C getrockneten Kot mit 100 ccm 2prozentiger Salzsäure am Rückflußkühler 1½ Stunden, neutralisiert nach dem Erkalten nahezu mit Natronlauge, saugt durch ein Asbestfilter ab, wäscht mit Wasser nach und füllt das Filtrat auf 200 ccm auf, das eventuell durch nochmaliges Filtrieren geklärt wird. Von dem Filtrat bringt man 50 ccm in eine Porzellanschale oder in ein Becherglas, fügt 60 ccm von der Allihnschen Lösung und 35 ccm Wasser hinzu und bestimmt den Zucker nach dem von Pflüger gegebenen Verfahren. Durch Multiplikation der gefundenen Menge Traubenzucker mit 0,94 erhält man die Menge Stärke.

14. Pentosane.

Die Bestimmung der Pentosane geschieht nach der von Tollens ausgearbeiteten Methode (siehe S. 49).

15. Fett.

Quantitative Bestimmung. Man bringt 10 g des luftgetrockneten Kotes in eine entfettete Papierhülse (siehe S. 61) und läßt 3 bis 4 Stunden im Trockenschrank stehen. Den so vorgetrockneten Kot extrahiert man dann mit Äther oder besser mit absolutem Alkohol und Chloroform in der S. 62 angegebenen Weise.

16. Neutralfette, freie und gebundene Fettsäuren.

Will man in den Fäzes das Fett und die Fettsäuren getrennt bestimmen, so verfährt man in folgender Weise: Zuerst wird das in angegebener Weise getrocknete und fein zerriebene Material, 10 g, mit Äther bis zur Erschöpfung extrahiert, filtriert, nach dem Verdunsten des Äthers mit Petroläther vom Siedepunkt 50—60° aufgenommen

¹⁾ J. Strassburger, Über den quantitativen Nachweis der leicht angreifbaren Kohlehydrate in menschlichen Fäzes. Pflügers Archiv **84**, 173 (1901).

und nach dem Verdunsten des Petroläthers getrocknet und gewogen. Der so erhaltene Extrakt wird in einem Gemisch von gleichen Teilen säurefreien absoluten Alkohols und Äthers gelöst und nach Zusatz von 2 Tropfen Phenolphthaleinlösung mit $\frac{1}{10}$ alkoholischer Normalnatronlauge titriert, die so erhaltene Zahl auf Ölsäure umgerechnet und von der gewogenen Fettmenge abgezogen. 1 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalnatronlauge entspricht 0,0282 g Ölsäure $C_{18}H_{34}O_2$. Man erhält auf solche Weise das im Kot enthaltene Neutralfett und freie Fettsäuren. Hierauf wird der mit Äther erschöpfte Rückstand in eine Porzellanschale (quantitativ) gebracht, mit einigen Tropfen absoluten Alkohols unter Zusatz von 1—2 Tropfen Salzsäure zum Brei verrieben, getrocknet und in einem Mörser fein zerrieben. Das Pulver wird dann wieder mit Äther extrahiert, wobei man die durch die Salzsäure in Freiheit gesetzten Fettsäuren gewinnt.

Bei der Bestimmung des Fettes in den Fäzes empfiehlt H. Poole ¹⁾, das Fett vom Cholesterin zu trennen. Zu diesem Zweck wird der Alkoholextrakt zuerst bei 100° C und dann bei 110° C getrocknet, hierauf mit alkoholischer Kalilauge verseift, wobei eine geringe Menge ungelöst bleibt. Die Seife nimmt man dann mit Wasser auf, verdampft den Alkohol, filtriert und schüttelt das Filtrat mehrmals mit Äther aus, wobei das Cholesterin in die ätherische Lösung übergeht. Hierauf wird die Seifenlösung bis zur Trockne eingedampft, darin die gebundenen Fettsäuren bestimmt und diese auf Butterfett umgerechnet.

17. Azeton.

Nachweis. Etwa 100 g frische Fäzes verreibt man mit Wasser zu einem dünnen Brei, säuert mit Phosphorsäure an und destilliert unter guter Kühlung etwa $\frac{1}{10}$ des Volumens ab. Das mit Salzsäure versetzte Destillat wird nochmals destilliert, bis etwa 20 ccm übergegangen sind.

Die Prüfung und quantitative Bestimmung erfolgen nach den beim Harn S. 375 angegebenen Verfahren.

18. Phenole.

Zum Nachweis der Phenole verreibt man die Fäzes mit Wasser zu einem dünnen Brei, destilliert ein Drittel des Volumens ab, übersättigt das Destillat mit Natronlauge, destilliert wieder ein Drittel ab. Hierauf übersättigt man den Rückstand mit Schwefelsäure, destilliert die Phenole ab und kocht einen aliquoten Teil mit Millons Reagens, wobei dunkelrote Färbung eventuell ein roter Niederschlag entsteht.

19. Oxalsäure.

Der zu untersuchende, lufttrockene Kot wird wiederholt mit Alkohol, dann mit Äther extrahiert, bis frisch aufgegossener Alkohol

¹⁾ H. Poole, Über die Bestimmung von Fett und Kasein in den Fäzes. Journ. Amer. Chem. Soc. 19, 877.

oder Äther sich nicht mehr färbt, der Rückstand mit salzsäurehaltigem Wasser ausgezogen, das Filtrat auf dem Wasserbade eingedampft, mit Ammoniak neutralisiert und mit Kalziumchlorid gefällt (siehe unter Harn).

20. Bernsteinsäure.

Nachweis. Dem Nachweis muß die Isolierung vorangehen. Zur Isolierung der Bernsteinsäure aus den Fäzes sind folgende Verfahren vorgeschlagen worden.

Nach von de Groot säuert man den Kot mit verdünnter Schwefelsäure an, destilliert im Dampfstrom die flüchtigen Fettsäuren ab, neutralisiert den Rückstand mit Ammoniak, schüttelt mit Tierkohle gut durch und filtriert. Hierauf versetzt man das Filtrat mit neutralem Bleiazetat, filtriert, wäscht den Niederschlag aus, verreibt ihn mit verdünnter Schwefelsäure, dampft fast bis zur Trockne ein und extrahiert den Rückstand mit einem Gemisch aus gleichen Teilen Alkohol und Äther. Den Alkoholätherauszug dampft man ein, löst den Rückstand in heißem Wasser, versetzt die Lösung mit Kalziumkarbonat und filtriert vom ausgeschiedenen Kalziumsulfat ab. Das Filtrat dampft man ein und überläßt es der Kristallisation. Falls keine Kristalle sich ausscheiden, versetzt man den Rückstand mit Eisenchlorid, wobei Bernsteinsäure einen braunen flockigen, in Wasser unlöslichen Niederschlag gibt, oder man glüht mit Ammoniak und Zinkstaub, wodurch Pyrrol entsteht, das man an der Rötung eines mit starker Salzsäure befeuchteten Fichtenspanns erkennt.

Nencki extrahiert den bei 100—105° C getrockneten Kot mit Äther, dann mit Chloroform und schließlich mit Alkohol. Der Rückstand des alkoholischen Auszuges wird mit Wasser gekocht und beim Erkalten ausgeschiedene Kristalle der Bernsteinsäure mittels der oben erwähnten Reaktionen identifiziert.

Die gleichzeitig vorhandene Milchsäure entfernt man nach der Angabe von Blumenthal, indem man den wässerigen bernsteinsäurehaltigen Auszug mit Bleihydroxyd kocht, auf dem Wasserbade bis zur Trockne eindampft, den Rückstand mit heißem Wasser aufnimmt, wobei das milchsaure Blei in Lösung geht. Der Rückstand wird nun mit Eisessig behandelt, die Lösung vom Blei durch Schwefelwasserstoff befreit und das Filtrat zur Trockne eingedampft. Die so erhaltene Bernsteinsäure wird durch Umkristallisieren aus einem Gemisch von gleichen Teilen Äther und Alkohol umkristallisiert.

21. Flüchtige Fettsäuren.

Nachweis. Der Kot wird mit Alkohol ausgezogen, der filtrierte alkoholische Auszug mit kohlensaurem Natrium neutralisiert und auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in Wasser suspendiert, mit verdünnter Phosphorsäure angesäuert und destilliert, bis das Destillat nicht mehr sauer reagiert. Das Destillat übersättigt man mit Natriumkarbonat, engt auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen ein und destilliert die mit

verdünnter Phosphorsäure angesäuerte Flüssigkeit im Dampfstrom. Einen aliquoten Teil des Destillates prüft man auf die Anwesenheit der einzelnen flüchtigen Fettsäuren in der bei Harn (S. 304) angegebenen Weise.

Quantitative Bestimmung. Die Gesamtmenge der flüchtigen Fettsäuren ermittelt man in der Weise, daß man das Destillat mit $\frac{1}{10}$ -Normalkalilauge unter Benutzung von Phenolphthalein als Indikator titriert und auf Essigsäure berechnet. 1 cem der $\frac{1}{10}$ -Normal-lauge entspricht 0,06 g Essigsäure.

Am besten eignet sich die Vakuumdestillation bei 50—60° C, unter einem Druck von 10—15 mm, wobei die Milchsäure im Rückstand bleibt und nicht in das Destillat übergeht, wie bei der gewöhnlichen Wasserdampfdestillation. Man verreibt den Kot mit Wasser zu einem dünnen Brei, säuert ihn mit Phosphorsäure an, bringt ihn in einem Claisenschen Kolben, stellt die Verbindung her, evakuiert, erhitzt das Wasserbad auf 50—60° C und destilliert unter Einleiten von Wasserdampf und Ersatz der verdampfenden Flüssigkeit durch Zufließenlassen von Wasser etwa 4 Stunden, wobei die flüchtigen Fettsäuren quantitativ übergehen. Um die übergehenden Fettsäuren vollständig zurückzuhalten, schaltet man eine zweite durch Eis gekühlte Vorlage ein (E. Welde)¹⁾.

22. Lezithin.

Darstellung und quantitative Bestimmung siehe S. 90.

23. Koprosterin $C_{27}H_{48}O$.

Vorkommen. Unter diesem Namen beschreibt Bondzynski²⁾ ein aus Menschenfäzes dargestelltes Cholesterin, das, wie es scheint, schon früher von Flint³⁾ in unreinem Zustande als Sterkorin dargestellt worden war. Das Exkretin von Marcet⁴⁾ war wahrscheinlich ein mehr oder weniger reines Koprosterin. Das Koprosterin entsteht im Darm durch Reduktion aus Cholesterin; eingeführtes Cholesterin erscheint in den Fäzes zum großen Teil als Koprosterin.

Eigenschaften. Das Koprosterin kristallisiert in langen feinen Nadeln vom Schmelzpunkt 95—96° C. Das von Marcet dargestellte Exkretin schmolz ebenfalls bei 95—96°, während das Sterkorin von Flint den Schmelzpunkt von 36° C hatte. Das Koprosterin ist in Wasser und Alkalien unlöslich, löst sich sehr leicht in Alkohol, Äther, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Benzol und Petroleumäther. Es ist optisch aktiv und zwar dreht es die Polarisations-ebene nach rechts; seine spezifische Drehung $[\alpha]_D = 24^\circ$ C.

Das Koprosterin gibt die bekannten Cholesterinreaktionen mit geringen Abweichungen. Eine Chloroformlösung des Koprosterins, mit dem gleichen Volumen konzentrierter Schwefelsäure versetzt, gibt anfangs nur eine gelbliche Färbung, die allmählich und nach längerem Stehen orangerot und dann dunkelrot wird. Beim Zusatz von Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure zu einer Chloroformlösung von Koprosterin tritt sofort eine Blaufärbung ein, die sich bald in eine Grünfärbung verwandelt. Das Koprosterin gibt nicht das charakteristische Farbenspiel beim Schmelzen seines Propionsäureesters.

¹⁾ E. Welde, Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung flüchtiger Fettsäuren. *Biochem. Zeitschr.* **23**, 504 (1910).

²⁾ Bondzynski, Über das Cholesterin der menschlichen Fäzes. *Chem. Ber.* **29**, 476 (1896).

³⁾ Flint, Über Sterkorin. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **23**, 363.

⁴⁾ Marcet, Mémoire sur l'excrétine. Nouveau principe immédiat des excréments humains. *Annal. chim. Physique* **59** (1860).

Darstellung. Das Exkretin stellt Hinterberger¹⁾ in folgender Weise dar. 214 g der frischen Exkremente wurden täglich mit 350 ccm Alkohol (90 Proz.) in einer mit Rückflußkühler versehenen Flasche ausgekocht, die Lösung abfiltriert und der Rückstand in der Flasche nochmals mit 175 ccm Alkohol extrahiert. Die alkoholische Lösung scheidet nach achttägigem Stehen einen Niederschlag aus, der aus Exkretin und dem Magnesiumsalz einer unbekannten Säure entsteht. Dieses Salz ist in Alkohol sehr schwer löslich und läßt sich durch Kristallisation vom Exkretin leicht trennen. Das alkoholische Filtrat versetzt man dann mit 20 ccm Kalkmilch und 500 ccm Wasser, wodurch ein hellbrauner Niederschlag entsteht, der nach 24 Stunden abfiltriert, mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet wird. — 35 g des lufttrocknen Kalkniederschlags kocht man in einer mit Rückflußkühler versehenen Flasche mit einer Mischung von 75 ccm Alkohol (90 Proz.) und 3 ccm Äther, filtriert und kocht den ungelösten Rückstand abermals mit 75 ccm Alkohol und 75 ccm Äther aus. Nach 8 Tage langem Stehen bei 0° scheidet sich das Exkretin in Form von gelben nadelförmigen Kristallen ab, die durch wiederholtes Umkristallisieren aus Alkohol gereinigt werden.

Zur Darstellung des Koprosterins werden frische menschliche Fäzes auf dem Wasserbade getrocknet und die fein zerriebene Masse im Soxhletapparat mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wird mit Natriumalkoholat behandelt, wodurch die Verseifung unter Ausscheidung der in Äther unlöslichen Natronseifen sofort eintritt. Die alkoholisch-ätherische Lösung wird nach einiger Zeit von den Seifen abfiltriert und der Äther verdunstet. Nach dem Verdunsten des Äthers wird die Lösung unter Zusatz von Wasser zur vollständigen Entfernung des Alkohols auf dem Wasserbade erwärmt, dann mit Wasser versetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Der Ätherauszug wird einigemal mit verdünnter Lauge und Wasser ausgeschüttelt, um die doch etwa übergegangenen Seifen vollständig zu entfernen. Nach dem Verdunsten des Äthers hinterbleibt ein Öl, das zu einem aus langen Nadeln bestehenden Kristallkuchen erstarrt. Durch Umkristallisieren aus Alkohol wird das Koprosterin gereinigt (Bondzynski).

50 g vom Ätherextrakt der Fäzes werden mit einer Mischung von 20 g Ätzkali, 50 g absolutem Alkohol und 20 ccm Wasser in einem Kölbchen mit aufgesetztem Trichter 25 Minuten lang auf dem Wasserbade verseift, auf 40° C abgekühlt, mit 300 ccm Wasser versetzt und nach dem Erkalten dreimal mit je 500 ccm Äther ausgeschüttelt. Nach dem Verdunsten des Äthers wird der Rückstand mit 0,5 g Ätzkali 5 Minuten lang auf dem Wasserbade erhitzt auf 20 ccm eingeeengt, 30 ccm Wasser hinzugesetzt und zweimal mit je 100 ccm Äther extrahiert. Das so erhaltene Koprosterin wird durch wiederholtes Umkristallisieren heißen Alkohols gereinigt (P. Müller)²⁾.

¹⁾ Hinterberger, Über das Exkretin. Lieb. Ann. 166, 213 (1873).

²⁾ P. Müller, Über die Reduktion des Cholesterins zu Koprosterin. Zeitschr. f. physiol. Chem. 29, 127.

Trennung des Koprosterins vom Cholesterin. Das Gemisch wird mit Brom behandelt, wodurch Cholesterin in das Bromid übergeführt wird, während das Koprosterin unverändert bleibt, da es sein Brom addiert. Aus diesem Gemisch wird dann das Koprosterin durch Extraktion mit Petroleumäther isoliert, in dem Cholesterinbromid absolut unlöslich ist.

Quantitative Bestimmung des Cholesterins siehe S. 90.

Hippokoprosterin



Bei der Untersuchung von Pferdefäzes haben Bondzynski und Humnicki¹⁾ einen cholesterinartigen Körper isoliert, der sowohl vom Cholesterin wie vom Koprosterin verschieden ist. Im Darm des Pferdes scheint das Cholesterin eine noch weitgehendere Reduktion zu erfahren. Das Hippokoprosterin scheidet sich aus kochendem Alkohol als Gallerte aus, die unter dem Mikroskop als aus kurzen Nadeln bestehend sich erweist; es schmilzt bei 74—75° C. In Wasser und Alkalien ist es unlöslich, in Alkohol ist es weniger löslich als Koprosterin, in den anderen Lösungsmitteln löst es sich leicht. Versetzt man seine Chloroformlösung mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure, so tritt zuerst eine intensive Violettfärbung ein, die einer Grünfärbung Platz macht. Es addiert kein Brom und zeigt in Ätherlösung eine schwache Rechtsdrehung.

Das Hippokoprosterin von Gittelmacher-Wilenko besteht aus zwei Körpern, dem in Alkohol leicht löslichen α -Hippokoprosterin $\text{C}_{27}\text{H}_{54}\text{O}$ und dem in Alkohol schwer löslichen β -Hippokoprosterin $\text{C}_{27}\text{H}_{52}\text{O}$.

Das α -Hippokoprosterin kristallisiert aus Alkohol in feinen rhombischen Tafeln; getrocknet, besteht es aus seidenglänzenden, weichen Schuppen die ihrer wachsartigen Konsistenz wegen sich nicht pulverisieren lassen. Es schmilzt bei 66—67° C und ist optisch inaktiv. Das α -Hippokoprosterin zeigt die Reaktionen der Cholesterine, jedoch nicht so intensiv wie diese.

Das β -Hippokoprosterin scheidet sich aus Alkohol beim Erkalten in Form eines gallertartigen Gerinnsels aus, das aus mikroskopischen Nadeln und Sternen besteht; in trockenem Zustande stellt es eine weiße amorphe Masse dar. In Alkohol, Äther und Chloroform ist es weniger löslich als die α -Verbindung. Sein Schmelzpunkt liegt bei 56° C.

24. Milchsäure.

Darstellung und Bestimmung. Man verreibt den Kot mit Wasser bis zu einem dünnen Brei, versetzt mit Barytwasser, filtriert, leitet Kohlensäure ein, wodurch das überschüssige Baryt ausfällt,

¹⁾ Humnicki, Über das Schicksal des Cholesterins im tierischen Organismus. Dissertation. 1898.

und dampft auf dem Wasserbade bis zum dünnen Sirup ein, den man dann allmählich mit dem zehnfachen Volumen absoluten Alkohols vermischt, kurze Zeit stehen läßt und abgießt. Den Rückstand löst man in wenig Wasser, und die Lösung wird in derselben Weise mit Alkohol behandelt. Der Alkohol der vereinigten alkoholischen Auszüge wird abdestilliert, der zurückbleibende dünne Sirup auf dem Wasserbade erwärmt, bis aller Alkohol verdunstet, nach dem Erkalten mit dem gleichen Volumen mäßig verdünnter Phosphorsäure versetzt und in eine große Flasche gebracht. Die Mischung wird nun mit großen Mengen Äther wiederholt geschüttelt, wobei die Milchsäure vollständig und zugleich auch etwas Phosphorsäure in Lösung geht. Der Äther der vereinigten und filtrierten ätherischen Auszüge wird abdestilliert, der Rückstand in Wasser gelöst, mit überschüssigem Zinkkarbonat gekocht, filtriert, der Niederschlag mit heißem Wasser gewaschen, das Filtrat auf ein kleines Volumen auf dem Wasserbade eingedampft und der Kristallisation überlassen. Die Mutterlauge liefert auf Zusatz von etwas Alkohol nach einigem Stehen weitere Kristalle. Fällt man die heiße Lösung des Zinksalzes mit Schwefelwasserstoff, filtriert und engt das Filtrat bis zum Sirup ein, so erhält man die freie Milchsäure, die man in der beim Harn (siehe S. 306) angegebenen Weise identifiziert (nach Hoppe-Seyler-Thierfelder).

25. Gepaarte Glukuronsäuren.

Man verrührt eine größere Menge Kot zum dünnen Brei, versetzt etwa 250 ccm des Breies mit einem kalten Gemisch aus 20 ccm Wasser und 30 ccm konzentrierter Schwefelsäure, läßt unter öfterem Umrühren einen Tag stehen und schüttelt dann mit einer Mischung von 300 ccm Alkohol und 1200 ccm Äther 12—24 Stunden lang. Der Äther wird nun abdestilliert, der Alkohol auf dem Wasserbade bis auf 200 ccm verjagt, die Flüssigkeit mit Tierkohle gekocht, filtriert und das Filtrat in der unter Harn angegebenen Weise geprüft (siehe S. 309).

26. Gepaarte Gallensäuren und Cholsäure.

Der zu untersuchende Kot wird mit Alkohol extrahiert, filtriert, der größte Teil des Alkohols auf dem Wasserbade verjagt, der Rückstand mit Salzsäure angesäuert, dann mit Barytwasser stark alkalisch gemacht, mit Kohlensäure gefällt, zum Kochen erhitzt, heiß filtriert und der Rückstand noch mehrmals mit Wasser ausgekocht. Nun dampft man die vereinigten Auszüge auf ein kleines Volumen ein, filtriert und läßt erkalten, wobei cholsaurer Baryt ausfällt, den man durch Behandeln mit Salzsäure in Cholsäure überführt, während glykocholsaurer und taurocholsaurer Baryt in Lösung bleiben. Die Trennung und Identifizierung der Glykocholsäure und Taurocholsäure geschieht in der beim Harn angegebenen Weise (siehe S. 362). Nach Ury verfährt man zum Nachweis der Gallensäuren so, daß man den Rückstand der wässerigen Auszüge unter Ersatz des verdampfenden

Wassers 3 Stunden mit 25 ccm einer 33prozentigen Natronlauge kocht, erkalten läßt, mit Schwefelsäure ansäuert und mit Äther ausschüttelt. Nach dem Verdunsten des Äthers löst man den Rückstand in wenig Natronlauge und prüft mit der Pettenkoferschen Reaktion.

Darstellung der Cholsäure. Der Kot wird mit Alkohol extrahiert, filtriert, unter Zusatz von etwas Essigsäure auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz eingedampft und der Rückstand mit kaltem Wasser ausgezogen. Den ungelösten Rückstand versetzt man mit etwas Wasser und Barytwasser, erwärmt, leitet Kohlensäure ein, erhitzt zum Sieden, filtriert heiß, kocht den Rückstand mit Wasser, vereint die heißfiltrierten Auszüge und dampft sie bis auf ein kleines Volumen ein. Die rückständige Flüssigkeit wird nun mit Äther und Salzsäure vermischt und stehen gelassen, wobei sich Cholsäure ausscheidet, die man abfiltriert, mit Wasser wäscht, in Alkohol löst, die Lösung mit Tierkohle behandelt, auf ein kleines Volumen einengt und der Kristallisation überläßt (Hoppe-Seyler).

Farbstoffe.

Bilirubin. Man verreibt die Fäzes mit Wasser, filtriert, macht das Filtrat mit einigen Tropfen Natriumkarbonat alkalisch und verfährt weiter wie beim Harn (S. 363.)

Steensma ¹⁾ empfiehlt, etwa 5 g Kot mit 95prozentigem Alkohol zu verreiben, in einem Kolben auf dem Wasserbade zu erhitzen, den Alkohol abzugießen, durch neuen zu ersetzen, solange, bis der Alkohol sich nicht mehr färbt. Der Rückstand wird nun in einer Reibschale mit etwas Kalilauge versetzt, mit Alkohol verrieben, vom Ungelösten abfiltriert, zu dem Filtrat wenig salzsäurehaltiger 95prozentiger Alkohol hinzugefügt und gekocht, wobei eine grüne Farbe entsteht; wenn nicht, fügt man einen Tropfen einer 0,5prozentigen Natriumnitritlösung hinzu.

Urobilin. Man verreibt nach A. Schmidt den zu prüfenden Kot in einem Glasschälchen mit wässriger gesättigter Quecksilberchloridlösung, läßt das bedeckte Schälchen bis zum nächsten Tage stehen und prüft makroskopisch und mikroskopisch, wobei die urobilinhaltigen Fäzes rosa- bis tiefrosenrot, die bilirubinhaltigen grün gefärbt sind.

Die Fäzes werden mit schwefelsäurehaltigem Alkohol extrahiert, der Alkoholauszug bei 45—50° C auf ein kleines Volumen eingedampft, mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Gegenwart von Urobilin weist man durch die spektroskopische Prüfung und die grüne Fluoreszenz der Chloroformlösung nach Zusatz von etwas Chlorzink und überschüssigem Ammoniak nach (Hoppe-Seyler) ²⁾.

¹⁾ Steensma, Über den Nachweis kleiner Mengen Gallenfarbstoffe in Fäzes. Zentralbl. f. d. ges. Physiologie und Pathologie des Stoffwechsels **3**, 231 (1908).

²⁾ G. Hoppe-Seyler, Über die Ausscheidung des Urobilins in Krankheiten. Virchows Archiv **124**, 30 (1891).

Schlesinger¹⁾ entfettet zuerst den Kot mit Äther, zieht den Rückstand mit säurehaltigem Alkohol aus, neutralisiert die Lösung mit Ammoniak und versetzt mit dem gleichen Volumen einer 10prozentigen Zinkacetatlösung in absolutem Alkohol — in Gegenwart von Urobilin erhält man eine schöne Fluoreszenz und deutliche Absorptionsspektren.

Darstellung. Zur Isolierung des Urobilins verreibt Fromholdt²⁾ den Kot mit dem mehrfachen Volumen Alkohol, filtriert nach zehnstündigem Stehen, wäscht den Niederschlag mit Alkohol nach, engt das Filtrat auf dem Wasserbade etwas ein und schüttelt es mit Petroläther wiederholt aus, bis dieser sich nicht mehr färbt. Hierauf dampft man die alkoholische Lösung im Vakuum fast zur Trockne ein, löst den Rückstand in Chloroform und gießt diese Lösung in Petroläther, wobei sich das Urobilin nach einigem Stehen in Form von Flöckchen ausscheidet, die am Boden des Gefäßes zusammenfließen. Man gießt nun den Petroläther ab, trocknet das Urobilin auf dem Wasserbade, löst es in Chloroform und gießt die Lösung wieder in Petroläther. Dieses Umkristallisieren wiederholt man einmal.

Quantitative Bestimmung. Nach Huppert (Verfahren von Méhn, Fr. Müller und Gerhardt) werden 20–40 g der frischen Fäzes mit der drei- bis sechsfachen Menge Wasser verrieben und mit dem gleichen Volumen heißer Barytmischung, aus 1 Volumen gesättigter Bariumchloridlösung und 2 Volumen Bariumhydroxydlösung bestehend, versetzt und aufgekocht. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit heißer Barytmischung verrieben, aufgekocht, filtriert und die Extraktion mit Barytmischung wiederholt, bis keine nennenswerte Menge Farbstoff mehr extrahiert werden kann. Die vereinigten Filtrate versetzt man mit einem geringen Überschuß konzentrierter Natriumsulfatlösung, filtriert das ausgefällte Bariumsulfat ab, wäscht es aus, neutralisiert das klare Filtrat mit Schwefelsäure, filtriert und sättigt das klare Filtrat vollständig mit pulverisiertem Ammoniumsulfat bei gewöhnlicher Temperatur. Der ausgefallene flockige Niederschlag wird mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen, an der Luft trocknen gelassen und mit einer mit Schwefelsäure angesäuerten Mischung von 2 Volumen Alkohol und 1 Volumen Äther bei mäßiger Wärme oder bei Zimmertemperatur extrahiert. Der Gehalt der so erhaltenen Lösung wird spektrophotometrisch bestimmt.

Urobilinogen. Zum Nachweis des Urobilinogens bedient man sich des Ehrlichschen Reagens. Da aber dieses auch mit Indol und Skatol reagiert, so müssen diese zuerst entfernt werden. Zu diesem Zweck verreibt man die Fäzes nach Neubauer mit Liproin, zieht den Rückstand mit Alkohol aus, filtriert und versetzt mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (2prozentige Lösung in 20prozentiger Salzsäure) — in Gegenwart von Urobilinogen färbt sich die Lösung sofort oder

¹⁾ Schlesinger, Deutsche mediz. Wochenschrift **29**, 561 (1903).

²⁾ G. Fromholdt, Über das Verhalten des Urobilins im Kaninchenorganismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie **53**, 340 (1907).

nach dem Aufkochen schön rot; spektroskopisch sieht man einen Streifen in Orange.

Biliverdin erkennt man an der Grünfärbung der Fäzes und des zur Extraktion benutzten Alkohols.

Hämatin. Die Fäzes werden mit schwefelsäurehaltigem Äther oder Alkohol extrahiert und spektroskopisch untersucht. Setzt man Natronlauge und Schwefelammonium zu, entsteht das Spektrum des Hämochromogens.

Chlorophyllan. Man extrahiert die angesäuerten Fäzes mit Äther, engt die ätherische Lösung ein und schüttelt sie mit dem gleichen Volumen konzentrierter Salzsäure, wobei bei Anwesenheit von Chlorophyllan Blaufärbung infolge Bildung von Chlorophyllansäure auftritt und ein Streifen zwischen B und C bei der spektroskopischen Prüfung beobachtet wird.

Monographien
über die
Zeugung beim Menschen

von

Dr. med. Hermann Rohleder,
Spezialarzt für Sexualleiden in Leipzig.

- Band I: Die Zeugung beim Menschen. Mit Anhang: Die künstliche Zeugung (Befruchtung) beim Menschen. M. 7.—, geb. M. 8.—.
Band II: Die Zeugung unter Blutsverwandten. M. 4.20, geb. M. 5.—.
Band III: Die Funktionsstörungen der Zeugung beim Manne. (Samenflüsse, Impotenz, Sterilität.) M. 5.80, geb. M. 6.80.
Band IV: Die libidinösen Funktionsstörungen der Zeugung beim Weibe. M. 2.80, geb. M. 3.60.

Alle 4 Bände zusammen gebunden 21 Mark.

Rohleder hat mit dem vorliegenden Werke geradezu erschöpfend ein Gebiet behandelt, das für die Ärzte ebenso wichtig ist, wie es ihnen unbekannt zu sein pflegt.

(Klinisch. therapeut. Wochenschrift.)

Grundriß der Physik für Mediziner

von

Ob.-St.-A. Dr. med. W. Guttman.

Mit 144 Abbildungen.

Zehnte bis zwölfte Auflage.

Geb. M. 3.80.

Dies kleine Physikbuch gibt in knappster Form alles, was der Mediziner aus der Physik wissen muß. Es eignet sich besonders zur Vorbereitung für das *Physikum* und kann für diesen Zweck den geplagten Kandidaten viel Zeit ersparen . . . Es hält mehr als es verspricht, und ist inhaltlich reicher, als nach seinem Umfange zu urteilen . . .

(Ärztlicher Praktiker.)

Kompendium der Entwicklungsgeschichte des Menschen

Mit Berücksichtigung der Wirbeltiere

von

Prof. Dr. L. Michaelis,
Privatdozent a. d. Univ. Berlin.

Mit 50 Abbildungen und 2 Tafeln.

Sechste Auflage.

Geb. M. 4. —.

Das Kompendium enthält in nuce alles Wissenswerte aus dieser täglich mehr in den Vordergrund tretenden Disziplin und steht, was man bekanntlich den Kompendien oft nicht nachsagen kann, auf ganz modernem wissenschaftlichen Standpunkt . . .

(Deutsche Medizinische Wochenschrift.)

Verlag von Georg Thieme in Leipzig.

Grundriss der Biochemie.

Für Ärzte und Studierende

von

Prof. Dr. phil. et med. C. Oppenheimer,
Berlin.

Gebunden M. 9.—.

Wer eine kurzgefaßte, den Bedürfnissen des Praktikers Rechnung tragende Orientierung dieses Gebietes wünscht, dem kann dieses neue Werk Oppenheimers nicht warm genug zur Anschaffung empfohlen werden. (Münchener medizinische Wochenschrift.)

Grundriss der Chemie

von

Prof. Dr. phil. et med. Carl Oppenheimer.

Anorganische Chemie.

Achte Auflage.

Geb. M. 3.50.

Organische Chemie.

Neunte Auflage.

Geb. M. 2.80.

Das schnelle Erscheinen von Oppenheimers Leitfaden zeugt wieder von den Vorzügen und der günstigen Aufnahme des Büchleins. Dem Charakter in erster Linie als Repetitorium entsprechend, ist der prägnante Inhalt bis auf die neueste Zeit sorgfältig ergänzt; das wird dazu beitragen, dem Leitfaden namentlich in den Kreisen der Medizinstudierenden neue Freunde zu erwerben. (Deutsche Medizinische Wochenschrift.)

Chemische Methodik für Ärzte

von

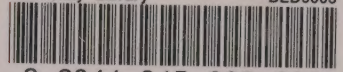
Prof. Dr. C. Oppenheimer,
Berlin.

Zweite Auflage, bearbeitet von Dr. W. Glikin, Berlin.

Geb. M. 2.40.

Eine Anleitung zum praktischen Arbeiten für den Arzt, der ohne spezielle chemische Ausbildung klinisch-chemische Untersuchungen auszuführen hat. Die neue Auflage ist revidiert und ältere Methoden sind durch neue ersetzt worden.

5.M.40.
Methodik der Stoffwechselanalysen 1916
Countway Library BED0003



3 2044 045 668 662

5.M.40.
Methodik der Stoffwechselanalys1916
Countway Library BED0003



3 2044 045 668 662

